Untersuchungen zur Genexpression bei dem Ciliaten Stylonychia lemnae nach Behandlung mit dem Pflanzenlectin Concanavalin A

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MARGITT MARIA WIESER
aus Ellwangen

1984

Untersuchungen zur Genexpression bei dem Ciliaten Stylonychia lemnae nach Behandlung mit dem Pflanzenlectin Concanavalin A

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MARGITT MARIA WIESER
aus Ellwangen

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	13. Dezember 1984
Dekan:	Professor Dr. H. U. Seitz
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Ammermann
2. Berichterstatter:	Privat-Dozent Dr. H. J. Lipps

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie III, Abteilung Zellbiologie, der Universität Tübingen durchgeführt. Herrn Prof. Dr. D. Ammermann möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Für ihre Diskussionsbereitschaft gilt mein Dank Dr. G. Steinbrück, P. Beck und Dr. H. Kraut. Bei Frau Dr. E. Helftenbein und Frau E. Müller bedanke ich mich für die Klonierung von Ma-DNS-Stücken und die Bereitstellung des klonierten a-Tubulin-Gens von Stylonychia lemnae.

Besonders bedanke ich mich bei Priv. Doz. Dr. H.J. Lipps für wertvolle Anregungen und ermutigendes Interesse an dieser Arbeit.

Mein Dank geht auch an die anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Abteilung. Namentlich seien genannt: Frau I. Dahlström für ihre zeitweilige Mithilfe bei der RNS-Isolierung, sowie Frau M. Schneck und Herr H. Schneider, die durch ihre Arbeit die für diese Untersuchungen benötigten umfangreichen Stylonychia-Kulturen bereitgestellt haben.

Für die Zusammenarbeit bei den Versuchen zur In-vitro-Translation möchte ich mich bei Frau M. Soose und Frau I. Isberner, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, bedanken.

Viele Anregungen erhielt ich durch die Teilnahme am "International Ciliate Molecular Biology Meeting" im August 1983. Die Teilnahme an dieser Tagung der Universität Colorado, USA, wurde mir durch ein Stipendium der Reinhold- und Maria-Teufel-Stiftung ermöglicht.

Die Teilnahme an dem DNS-Sequenzierkurs im Mai 1984 am MPI für Immunologie/Freiburg wurde mir durch eine großzügige Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	5
2.1. Untersuchungsobjekt und Kulturmethode	5
2.1.1. Kultur von Stylonychia lemnae	5
2.1.2. Concanavalin A-Behandlung	5
2.2. Nucleinsäure-Isolierungen aus Stylonychia	5
2.2.1. Makronucleus-DNS	5
2.2.2. Gesamt-Nucleinsäuren (RNS und DNS)	6
2.2.2.1. Gesamt-RNS	7
2.2.3. Gesamt-RNS ohne Phenolextraktion	7
2.2.4. m-RNS aus der Polysomenfraktion	8
2.2.5. Kern-RNS	9
2.2.6. Verwendung von RNase-Hemmern	9
2.3. Größen-, Konzentrations- und Reinheits-besimmungen von DNS und RNS	10
2.3.1. Spektrophotometrische Konzentrationsbestimung	10
2.3.2. Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Ethidiumbromidfärbung	10
2.3.3. Diphenylaminreaktion zur DNS-Bestimmung	11
2.3.4. Gelelektrophoretische Auftrennungen	
2.3.4.1. Polyacrylamid/Harnstoffgel (RNS)	11
2.3.4.2. Agarosegel mit Glyoxal und DMSO (RNS)	12
2.3.4.3. Agarosegel mit Formaldehyd (RNS)	13
2.3.4.4. Agarosegel (DNS)	13

Seite

2.4. Markierung von RNS und DNS mit P-32
2.4.1. 5'-Endenmarkierung der RNS 14
2.4.1.1. Alkalische Phosphatasebehandlung und Hydrolyse 14
2.4.1.2. Markierungsbedingungen 14
2.4.2. Nick-Translation der DNS 15
2.5. DNS-Klonierung 15
2.5.1. Gelelektrophoretische DNS-Anreicherung 16
2.5.2. Elution der DNS aus dem Gel 16
2.5.3. Plasmid-Transformation 17
2.5.4. Antibiotikum-Selektion 18
2.6. Plasmid-Isolierung und -Reinigung 18
2.6.1. Kulturbedingungen für transformierte Bakterien 18
2.6.2. Plasmidamplifikation 19
2.6.3. Bakterienlyse und Plasmidisolierung 19
2.6.4. Reinigung der Plasmid-DNS 20
2.7. Hybridisierungsexperimente 21
2.7.1. Koloniefilterhybridisierung 21
2.7.2. Gelhybridisierung 22
2.7.3. Filterhybridisierung 22
2.7.3.1. Dot-Hybridisierung
2.7.3.1.1. mit fixierter DNS 22
2.7.3.1.2. mit fixierter RNS 23
2.7.3.2. Gel-Filter-Transfer von Nucleinsäuren
2.7.3.2.1. SOUTHERN-Transfer für DNS 24
2.7.3.2.2. NORTHERN-Transfer für RNS 24
2.7.4. Hybridisierungsbedingungen 24
2.7.5. Autoradiographie 25

Seite

2.8. Verdau von DNS mit Nucleasen
2.8.1. DNS-Fragmentierung mit Restriktionsenzymen 25
2.9. Proteinuntersuchungen 25
2.9.1. In vivo-Markierung der Proteine 25
2.9.2. Proteinaufarbeitung
2.9.2.1. Gesamt-Proteine 26
2.9.2.2. Kern-Proteine 26
2.9.3. Ein-dimensionale Gelelektrophorese 26
2.9.4. Zwei-dimensionale Gelelektrophorese 27
2.9.5. Proteinfärbungen
2.9.5.1. mit Coomassie Blue 28
2.9.5.2. mit Silber 28
2.9.6. Fluorographie 29
2.9.7. Immunenzymatischer Nachweis der Tubulin-Proteine 29
2.10. Versuche zur Translation der RNS 30
2.10.1. In-vitro-Translation im Retikulocyten-System 30
2.10.2. In-vivo-Translation nach Injektion in Xenopus-Oocyten 30
3. ERGEBNISSE 31
3.1. Isolierung der RNS für die zeitabhängige Konzentrationsmessung spezifischer RNS nach Con A-Behandlung 31
3.2. Isolierung der an der Regulation beteiligten Gen-großen Ma-DNS-Stücke 32
3.2.1. Molekulargewichtsbestimmung der interessierenden Ma-DNS-Stücke 32
3.2.2. Anreicherung und Klonierung von Ma-DNS-Stücken eines definierten Molekulargewichtsbereichs 34

Seite

3.2.3. Selektionierung der klonierten Ma-DNS-Stücke 34
3.2.3.1. Koloniefilterhybridisierung der transformierten Insert-Plasmid-DNS mit P-32-RNS 35
3.2.3.2. Gelhybridisierung der klonierten Ma-DNS-Stücke mit P-32-RNS 35
3.2.3.3. Dot-Hybridisierung fixierter RNS mit klonierten P-32-Ma-DNS-Stücken 38
3.3. Charakterisierung der getesteten Ma-DNSx-Stücke und deren Transkriptionsprodukte
3.3.1. Größenbestimmung der klonierten Ma-DNS-Stücke 40
3.3.2. Größenbestimmung der m-RNSx 41
3.4. Kopienzahlbestimmung der Gen-großen Ma-DNSx-Stücke und ihrer Transkriptionsprodukte 41
3.4.1. Kopienzahl der Ma-DNSx-Stücke 42
3.4.2. Bestimmung des Umrechnungsfaktors für RNS/DNS-Filterhybridisierungen 44
3.4.3. Bestimmung der RNS-Menge einer Zelle 45
3.4.4. Bestimmung des DNSx/RNSx-Kopienzahlverhältnisses 47
3.5. Genregulation aufgrund selektiver DNS-Amplifikation? 49
3.6. Versuche zur Translation der RNS aus Stylonychia 51
3.6.1. In-vitro-Translation 51
3.6.2. In-vivo-Translation 52
3.7. Proteinsynthese der Zellen nach Con A-Behandlung 52
3.7.1. Ein-dimensionale Elektrophorese 52
3.7.2. Zwei-dimensionale Elektrophorese 57
3.7.3. Identifizierung der Tubulin-Proteine 57

Seite

4. DISKUSSION 63
5. ZUSAMMEMFASSUNG 71
6. ABKÜRZUNGEN UND CHEMIKALIEN 73
7. LITERATURVERZEICHNIS 78

1. EINLEITUNG

In vielzelligen Organismen ist die differentielle Genexpression Grundlage von Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen. Sie erklärt die morphologische und funktionelle Spezialisierung der Einzelzellen eines Organismus, die weitgehend über die gleiche genetische Information verfügen.

In den letzten Jahren konnte für Eukaryontenzellen gezeigt werden, daß sie ihre Genexpression auf sehr verschiedenen Ebenen kontrollieren können (Übersichten: Brown, 1981; Darnell, 1982). Diese Kontrollmöglichkeiten reichen von einer regulierten Transkriptionsrate spezifischer m-RNS (z.B. des Metallothionin-Gens, Karin et al., 1984; faktorenabhängige, selektive Transkription bei HeLa-Zellen, Dynan und Tjian, 1983) bis zu einer Posttranslationskontrolle, bei der bereits synthetisierte Proteine modifiziert werden (z.B. Wirkung von Wachstumsfaktoren und Oncogenen; Hunter, 1984 a,b).

Zur Klärung der Mechanismen differentieller Genexpression sind vor allem diejenigen Gene von Interesse, deren Aktivität im Rahmen eines Differenzierungsprozesses gesteuert wird. Mit Hilfe solcher Gene konnten bisher eine Reihe von DNS-Sequenzen charakterisiert werden, die als regulatorische Elemente die Transkription in RNS beeinflussen (z.B. Hitzeschockpromotoren bei Drosophila, Bonner et al., 1984). Von einer Reihe dieser Sequenzen wird angenommen, daß sie in Konformationsänderungen der DNS verwickelt sind, die einen selektiven Zugang der RNS-Polymerasen zum DNS-Template erlauben oder die Doppelhelix an der Transkriptionsinitiationsstelle selektiv öffnen.

DNS-Strukturen, die in der Nähe der Transkriptionsinitiationsstelle liegen und gewöhnlich als Promotoren in Analogie zu den Verhältnissen bei den Prokaryonten bezeichnet werden, bestehen aus einer kurzen Sequenz wie z.B. der TATA-Box (Hogness-Box). Diese hilft wahrscheinlich der

RNS-Polymerase II den Transkriptionsstart zu finden (Lewin, 1980).

Eine als Enhancer bezeichnete, weitere Klasse von DNS-Sequenzen, die die Transkriptionsrate eines Gens beeinflussen, können über weite Distanzen wirken (Übersicht: Khoury und Gruss, 1983). Die Enhancer wurden zuerst bei MMS- und SV40-Viren identifiziert und zeigen Wirtsspezifität (Laimins et al., 1982). Die Rolle der Enhancer bei der gewebsspezifischen Transkription (Gilles et al., 1983; Schibler et al., 1983; Fritton et al., 1984) und bei der Aktivierung von Oncogenen (Übersicht: Klein, 1983) wird zunehmend deutlicher.
Die Wirkung einer Enhancer-Sequenz auf die Transkriptionseffektivität der DNS dürfte von mehreren Parametern bestimmt werden. Hierzu zählen der Methylierungsgrad der DNS, die Ionenumgebung, die Wechselwirkung von chromosomalen Strukturproteinen und weitere Faktoren (Khoury und Gruss, 1983).

Bisherige Untersuchungen über das Chromatin und die DNS des Ciliaten Stylonychia lemnae zeigten vorteilhafte Eigenschaften, die diesen Organismus als lohnendes Untersuchungsobjekt für Fragen der Genomorganisation und Genregulation erscheinen lassen. Dieser Einzeller besitzt zwei getrennte, in ihrer Transkriptionsaktivität sehr verschiedene Kerne (Ammermann, 1970; Riewe und Lipps, 1977). Dem transkriptionsinaktiven Mikronucleus fällt die zentrale Rolle bei der geschlechtlichen Fortpflanzung zu, die Meiose, die Rekombination der Gene und die Weitergabe des genetischen Materials an die Folgegeneration. Die DNS im Mikronucleus hat vermutlich Chromosomenlänge und analog zu anderen Eukaryontengenomen finden sich hier über 50 % repetitive DNS-Sequenzen (Ammermann et al., 1974).

Demgegenüber steuert der Makronucleus den gesamten Zellstoffwechsel, und zwar nicht nur den "täglich" ablaufenden Zellcyclus, sondern auch alle seltener stattfindenden Vorgänge, wie z.B. Cystenbildung, die Konjugation sowie Regenerationsleistungen nach Verletzung der Zelle. So synthetisiert der Makronucleus z.B. kurz nach erfolgter Konjugation langlebige RNS, die

für die Zellentwicklung der folgenden vier Tage verantwortlich ist (Sapra und Ammermann, 1973 und 1974). Zu diesen Leistungen ist der Makronucleus fähig, obwohl im Verlauf seiner Entwicklung aus dem Mikronucleusgenom 98 % der DNS-Sequenzen eliminiert werden. Die Komplexität des Makronucleusgenoms wird dabei drastisch reduziert. Sie beträgt nur noch das 11-fache von E.coli (Steinbrück et al., 1981).

Der funktionelle Unterschied zwischen Makro- und Mikronucleus wird noch dadurch verdeutlicht, daß sich nur im Makronucleus Z-DNS nachweisen läßt (Lipps et al., 1983). Dieser durch spezifische Antikörper nachgewiesenen Z-Konformation der DNS werden neben strukturellen auch regulatorische Funktionen zugeschrieben (Nordheim et al., 1982).

Von großem Vorteil erweist sich die Besonderheit des Makronucleus, daß seine DNS nicht chromosomal, sondern in Gen-großen DNS-Molekülen angelegt ist (Prescott et al., 1973; Lipps Steinbrück, 1978; Elsevier et al., 1978). Diese DNS-Moleküle des Makronucleus, - es sind ca. 10.000 bis 15.000 verschiedene (Nock, 1981) -, liegen in einer Sequenzlänge zwischen 21 und 0,45 Kbp vor (Lipps und Steinbrück, 1978). Sie enthalten außer der codierenden Region wahrscheinlich alle Sequenzen, die für deren Transkription und Replikation nötig sind (Lawn et al., 1978; Lipps et al., 1978; Helftenbein, 1984).

Um detailiertere Einblicke in die Regulationsmechanismen der Genexpression einer Eukaryontenzelle zu bekommen, erscheint es daher lohnenswert, solche Makronucleus-DNS-Moleküle zu isolieren und zu charakterisieren, die in ein Regulationsgeschehen verwickelt sind und möglicherweise koordiniert reguliert werden.

Nach Behandlung von Stylonychia lemnae mit dem Pflanzenlectin Concanavalin A wirft die Zelle ihre Pellicula ab. Im Verlauf der Pellicularegeneration ist ein RNS-Syntheseanstieg zu beobachten (Lipps und Bessler, 1977). Diese RNS enthält offensichtlich Sequenzen spezifischer Gene, die in unbehandelten Zellen nicht oder nur in geringem Umfang transkribiert werden (Knowles et al., 1978).

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, aus dem Makronucleus solche Gen-große DNS-Stücke zu isolieren, deren RNS im Verlauf der Stimulation quantitative Unterschiede zeigen. Weiterhin soll untersucht werden, ob damit auch veränderte Proteinsynthesen einhergehen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit soll für vier verschiedene, klonierte Ma-DNS-Stücke gezeigt werden, inwiefern eine zahlenmäßige Korrelation zwischen den jeweiligen Kopienzahlen spezifischer Ma-DNS-Moleküle und deren m-RNS besteht. Die Resultate könnten Hinweise geben, ob Stylonychia lemnae Regulationsmechanismen besitzt wie z.B. unterschiedliche Transkriptionsrate einzelner Gene oder unterschiedliche Lebensdauer einzelner m-RNS-Sequenzen.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit könnten auf mögliche Kontrollmechanismen der Genexpression bei Stylonychia lemnae hinweisen. Außerdem wäre durch die Klonierung und Isolierung von Ma-DNS-Molekülen koordiniert regulierter Gene eine wesentliche Grundlage geschaffen, die weitere Detailuntersuchungen der Transkriptionsregulation einer Eukaryontenzelle ermöglicht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchungsobjekt und Kulturmethode

2.1.1. Kultur von Stylonychia lemnae

Die Untersuchungen wurden mit dem hypotrichen Ciliaten Stylonychia lemnae durchgeführt (Ammermann und Schlegel, 1983; Steinbrück und Schlegel, 1983). Zu vergleichenden Versuchen wurde, soweit es technisch möglich war, nur ein Klon des Ciliaten herangezogen.
Die Zellen wuchsen bei Zimmertemperatur (20 - 25°C) in Pringsheim-Lösung (Ammermann et al., 1974), wobei sie täglich mit dem Flagellaten Chlorogonium elongatum gefüttert wurden.

2.1.2. Concanavalin A-Behandlung

Die für die Induktion der Pellicularegeneration (Frisch et al., 1976) benötigte Concanavalin A- Konzentration hing vom Zustand der Zellen ab, der durch Nahrungsangebot, -aufnahme und eventuelle Bakterieninfektionen der Zellkulturen bedingt war. Ausgehend von einer Con A-Stammlösung*(4,3 mg/ml in 0,5 M NaCl) wurden die vorkonzentrierten Zellen in der Regel mit 4,7 - 6,8 µg Con A/ml Kulturmedium behandelt.

2.2. Nucleinsäure-Isolierungen aus Stylonychia lemnae

2.2.1. Makronucleus-DNS

Die Makronuclei für die DNS-Isolierung wurden nach Ammermann et al., 1974, angereichert. Dazu wurden die Zellen in kalibrierten Zentrifugengläsern (Erdölprüfer 3113, Heraeus Christ) bei 40 g für 3 - 5 min konzentriert. Nach Abpipettieren des Oberstandes wurde zu den Zellen das 2 - 3-fache Volumen kaltes Lysiermedium A (0,01 % Spermidinphosphatx6H2O; 0,05 % Triton X-100) gegeben. Nach 2 - 3 min waren die Zellen lysiert. Um reine

* Concanavalin A (Con A) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. W.G. Bessler, Institut für Mikrobiologie, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Makronucleus-DNS isolieren zu können, wurden die Mikronuclei und weitere Zellfragmente durch eine Nickel-Gaze mit 10 µm Maschenweite gespült. Eine weitere Reinigung der Zellkerne erfolgte durch Zentrifugation des Lysats über eine 6 cm hohe Saccharose-Lösung in Lysiermedium A. Die Zellkerne und einige Granula pelletierten nach 15 min bei 400 g. Die Makronuclei wurden in 2 - 4 ml Kavenoff-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH=9,5); 0,5 M EDTA; 1 % SDS) (Kavenof und Zimm, 1973) aufgenommen und für 10 min auf 65°C erwärmt. Nach Abkühlen auf 50°C wurde Proteinase K bis zu einer EK von 1 mg/ml zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNS zwei Mal mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und die wässrige Phase gegen 2 X 2l TE-Puffer dialysiert. Nach Zugabe von NaAc (EK: 0,3 M) wurde die DNS mit 2,5 Vol. Äthanol bei -20°C gefällt. Die pelletierte DNS wurde kurz unter Vakuum getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen. Nach einem RNase- (100 µg/ml) und Amylase- (100 µg/ml) Verdau (30 min bei 37°C) wurde die Lösung mit Proteinase K inkubiert. (100 µg/ml; 30 min bei 37°C). Anschließend wurde die DNS mit Phenol/Chloroform extrahiert und in Gegenwart von NaAc (0,3 M) und MgCl2 (10 mM) mit 2,5 Vol. Äthanol bei -20°C gefällt.

2.2.2. Gesamt-Nucleinsäuren

Generell wurden für die RNS-Präparationen und -Aufarbeitungen autoklavierte Gefäße und Geräte benutzt. Hitzelabile Lösungen wie z.B. Saccharose- und BSA-Lösungen wurden einige Stunden mit 1/1000 Vol. DEP gerührt und vor Gebrauch der Lösung wurde das DEP bei 70°C zerstört (Solymosy et al., 1968).

Für einen Isolierungsansatz wurde in der Regel von 80 dichten Kulturschalen mit einen Tag hungernden Zellen (6 - $8x10^6$ Zellen) ausgegangen. Der Inhalt von je 10 Schalen wurde zuerst über eine Polyamid-Gaze der Maschenweite 90 µm gegeben, um gröbere Verunreinigungen zu entfernen. Die Zellen wurden dann auf einer 30 µm-Gaze gesammelt, mit etwas Pringsheim-Lösung gespült und in eine frische Petrischale überführt. Je 2 dieser vorkonzentrierten Schalen wurden wieder auf eine 30 µm-Gaze gegeben, mit 20 ml niederionigem Puffer (0,35 mM KCl; 0,11 mM Na2PO4x2H2O (pH=6,8)) in kalibrierte Zentrifugengläser (Erdölprüfer, 3113, Heraeus Christ) gespült und für

1 - 2 min bei ca. 40 g (700 rpm) in einer Tischzentrifuge (Labofuge II, Heraeus Christ) konzentriert. Die ca. 2,5 ml dichte Zellsuspension wurde schnell in einen eisgekühlten Dounce-Homogenisator (L) mit 12 ml vorgekühltem Puffer B1 gegeben und durch 5 - 6 Potterbewegungen homogenisiert. (Puffer B1: 0,86 M $MgCl_2$; 17,5 mM Tris (pH=8,5); 0,2 % SDS; mit Phenol gesättigt)
Die Homogenisations- und Extraktionsbedinungen wurden nach Penman, 1969; Scherrer, 1969 und Kirby, 1968 zusammengestellt: Die eigentliche Extraktion der Nucleinsäuren geschah mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch, das dem wässrigen Zellysat im Verhältnis 1:1 zugesetzt wurde. Insgesamt wurde drei Mal bei Zimmertemperatur mit jeweils frischem Phenol/Chloroform extrahiert. Die erste Inter- und Phenolphase wurde mit 20 ml 1:10 verdünntem Puffer B1 (0.02 % SDS) reextrahiert und anschließend zusammen mit der ersten wässrigen Phase noch einmal extrahiert. Zur wässrigen Phase wurde NaAc (EK: 0,3 M) und 2,5 Vol. Äthanol gegeben und die Nucleinsäuren bei -20°C über Nacht gefällt.

2.2.2.1. Gesamt-RNS

Die nach 2.2.2. gewonnen Nucleinsäuren wurden nach der Äthanolfällung über einen diskontinuierlichen CsCl-Gradienten (Glisin et al., 1974) analog der Kern-RNS/DNS-Trennung (2.2.4.) getrennt.

2.2.3. Gesamt-RNS ohne Phenolextraktion

Für die bei Glisin et al., 1974, beschriebene RNS-Isolierungsmethode wurden die Zellen wie unter Kap. 2.2.2. beschrieben konzentriert. Die 2.5 ml Zellsuspension wurden mit dem 4-fachen Volumen 0,1 M Tris-HCl (pH=8,0) und 4 % N-Lauroylsarkosin (Sigma) in einem Dounce-Homogensisator bei 0°C gepottert. Nach 10 min bei Zimmertemperatur wurde pro ml Homogenat 1 g hitzesterilisiertes CsCl zugegeben. In einem Zentrifugenröhrchen wurde das Homogenat über 2,4 ml 5,7 M CsCl, 0,1 M EDTA (pH=7,5) geschichtet und 21 h bei 20°C mit 35.000 rpm im SW 41-Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Das RNS-Pellet wurde analog Kap. 2.2.5. weiterverarbeitet.

2.2.4. m-RNS aus der Polysomenfraktion

Die Methode zur m-RNS-Anreicherung wurde nach Palacios et al., 1972 und Buell et al., 1978 zusammengestellt. Sie diente der Anreicherung von m-RNS, die im Gegesatz zur Poly A+ -RNS Anreicherung auch Poly A- -RNS beinhaltet. 10 ml vorkonzentrierte Zellen (analog 2.2.1) wurden in ein Pottergefäß mit 1/3 Vol. eisgekühlten Homogenisationspuffer (30 mM Tris-HCl (pH=7.8); 80 mM KCl; 10 mM MgCl2; 0,2 M Saccharose; 0,15 % Triton X-100; 0,1 % Heparin; 5 x 10 % ß-Mercaptoäthanol) pipettiert. Nach 3 - 4 Stempelbewegungen waren die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 4.000 g (4°C) die Zellkerne pelletiert. Der Überstand wurde mit weiterem Triton X-100 (EK: 0,4 %) versetzt und auf Eis für 3 - 4 min gerührt, um am Endoplasmatischen Retikulum hängende Polysomen abzulösen. Weitere Zellfragmente wurden dann in 15 min bei 10.000 g pelletiert. Der Überstand wurde in Polyallomer-Röhrchen (SW 41-Rotor; Beckmann) geschichtet, in denen sich bereits ein diskontinuierlicher Sucrosegradient mit folgender Zusammensetzung befand: 2 ml 2,5 M Sucrose überschichtet mit 4 ml 1 M Sucrose (Sucrose in 1 X Homogenisationspuffer mit 50 µg/ml Heparin, ohne Triton und ß-Mercaptoäthanol). Nach einer 2-stündigen Zentrifugation (SW 41-Rotor, Beckmann; 4°C) bei 170.000 g (40.000 rpm) bildeten die Polysomen zwischen den beiden Sucroseschichten eine Bande. Diese "Interphasenscheibe" wurde durch seitliches Anstechen des Röhrchens mit einer Spritze abgezogen. Die angereicherten Polysomen wurden 1.5 h bei 4°C gegen 2 X 2 l 10 mMTris (pH=7.6); 0,5 mM MgCl2; 1 mM K+-EDTA dialysiert. Durch den verminderten Mg-Gehalt zerfallen die Ribosomen in ihre Untereinheiten und die m-RNS geht in Lösung. Das Dialysat wurde anschließend auf eine Mg-Konzentration von 20 mM eingestellt und die ribosomalen Untereinheiten wurden bei 270.000 g (SW 65-Rotor, Beckmann; 4°C; 3 h) pelletiert. Der m-RNS-haltige Überstand und das Pellet mit den Ribosomenuntereinheiten wurde getrennt mit SDS (EK: 0,1 %) versetzt und zwei Mal mit Phenol/Chloroform extrahiert. Aus der wässrigen Phase wurde die RNS nach Zugabe von NaAc (EK: 0,3 M) ü. N. bei -20°C gefällt.
Die Effektivität der Anreicherung wurde durch photometrische Ausbeutebestimmung der RNS im Pellet und im Überstand angegeben. Zur qualitativen Kontrolle dienten ferner Gelelektrophoresen (2.3.4.).

2.2.5. Kern-RNS

Zur Isolierung der Kern-RNS wurden zunächst die Makronuclei nach der unter 2.2.1. zur Isolierung von Ma-DNS beschriebenen Methode angereichert. Im Anschluß an die Reinigung über das 1,4 M Saccharose-Kissen wurden die Kerne nochmals in Lysiermedium A aufgenommen und 2 min bei 4.000 g zentrifugiert. Das Kernpellet wurde in 10 mM Tris (pH=7,6); 0,2 % SDS, 0,1 mg Heparin/ml lysiert. Nach einmaliger Phenol/Chloroform-Extraktion wurden RNS und DNS mit Hilfe eines diskontinuierlichen CsCl-Gradienten (Glisin et al., 1974) getrennt. Hierzu wurden in einem Polyallomer-Röhrchen (SW41-Rotor; Beckmann) 2,4 ml einer 5,7 M CsCl-Lösung (Brechungsindex n = 1,4025) mit einer CsCl-Lösung der Dichte 0,75 g/ml (n = 1,388), in der auch die Nucleinsäuren gelöst waren, überschichtet. Ein Röhrchen wurde mit ca. 6 OD 260 Nucleinsäuren beladen. Nach einem 20 - 24-stündigen Zentrifugationslauf (Ultrazentrifuge Beckmann) bei 35.000 rpm (140.000 g) und 20°C bildete die DNS am CsCl-Konzentrationssprung eine Bande, während die RNS pelletierte. Dieses RNS-Pellet wurde je nach weiterer Verwendung aufgearbeitet. Für eine RNS-Endmarkierung (2.4.1.) wurde das Pellet in 10 mM Tris-Lösung (pH=7,6) aufgenommen, gegen 3 X 1 l 10 mM Tris-HCl (pH=7,6) bei 4°C dialysiert und die RNS mit 2,5 Vol. Äthanol gefällt.
Für Dot-Hybridisierungen (2.7.3.1.) wurde das RNS-Pellet mit 3 ml A.bidest. verdünnt und unmittelbar danach mit 2,5 Vol. Äthanol gefällt. Verbleibendes CsCl wurde durch 1 - 2 weitere Fällungen der RNS entfernt.
Um eine in Spuren verbleibende DNS-Kontamination zu entfernen, wurde ein DNase I - Verdau (100 µg/ml; RNase-frei, BRL) bei 25°C in 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl2; 10 mM Tris (pH=7,6) für 20 min angeschlossen.

2.2.6. Verwendung von RNase-Hemmern

Um den enzymatischen Abbau der RNS so niedrig wie möglich zu halten, wurden neben den allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen (s.Kap. 2.2.2.) in einigen Experimenten RNase-Hemmer eingesetzt. Die Wahl des eingesetzten RNase-Hemmers hing vom weiteren Verwendungszweck der isolierten RNS ab. So hatte sich Heparin (Berridge et al., 1976) bei den Isolierungen von Kern- und m-RNS bewährt (s.Kap. 2.2.4. - 2.2.5.). Als sehr wirksamer RNase-Hemmer

erwies sich die Aurintricarbonsäure, die jedoch nur selten eingesetzt werden konnte, da sie entgegen den Beschreibungen bei Hallick et al., 1977, nach der Präparation nicht in ausreichendem Maße von den Nucleinsäuren entfernt werden konnte. Die Aurintricarbonsäure inhibiert auch andere enzymatische Reaktionen, und durch Eigenabsorption im UV-Bereich stört sie die spektrophotometrische Konzentrationsmessungen der Nucleinsäuren.
Der RNase-Hemmer RNasin (Blackburn und Jailkhani, 1979) wurde z.T. zu RNS gegeben, die für In-vitro-Translationsexperimente eingesetzt wurde, zeigte jedoch hier keinen wesentlichen Einfluß.
Wurde die RNS bei einer anschließenden enzymatischen Reaktion wie der Kinase-Reaktion zur Endmarkierung der RNS (s.Kap. 2.4.) verwendet, so wurde auf RNase-Hemmer verzichtet, da diese die Enzymreaktion negativ beeinflußten.

2.3. Größen-, Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von RNS und DNS

2.3.1. Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsmessungen von DNS- bzw. RNS-Lösungen wurden bei 260 nm im Spektralphotometer (Zeiss, PM 6 und PM Q II) in Quarzküvetten gegen das jeweilige Lösungsmittel durchgeführt. Dabei wurde die optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm (OD 260) entsprechend 50 µg/ml DNS bzw. 40 µg/ml RNS gesetzt. Als Reinheitskriterien dienten die Absorptionsverhältnisse:

$$OD\ 260/OD\ 230 > 2{,}0\ ;\ OD\ 260/OD\ 280 < 2^{*}$$

*(DNS: 1,8; RNS: 2,0)

(Scherrer, 1969)

2.3.1. Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Ethidiumbromidfärbung

Diese Methode der quantitativen Nucleinsäurebestimmung (Davis et al., 1980) eignet sich vor allem für jene Fälle, in denen nur geringe DNS- bzw. RNS-Mengen zur Verfügung stehen.
Das Prinzip beruht auf der Auswertung einer UV-induzierten Fluoreszenz der Ethidiumbromid/DNS-Komplexe. Da diese sichtbare Fluoreszenz innerhalb eines

bestimmten Bereiches proportional zur vorhandenen DNS-Menge ist, kann eine unbekannte DNS-Menge durch Vergleich mit einer Standard-DNS-Reihe bestimmt werden. Ab 3 - 5 ng DNS können mit dieser Methode nachgewiesen werden.
Je 2 - 5 µl DNS-Lösung wurden auf eine Folie, die auf einer UV-Platte (Transilluminator, 302 nm; Hermle) lag, pipettiert. Als Standard dienten Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0,5 - 20 µg DNS/ml. In jeden Lösungstropfen wurde das gleiche Volumen Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) gerührt und die Fluoreszenzintensitäten verglichen.

2.3.3. Diphenylamin-Reaktion zur DNS-Bestimmung

Dieser quantitative DNS-Nachweis (Giles and Myers, 1965) wurde durchgeführt, um eventuelle DNS-Spuren in der für die RNS/DNS-Hybridisierung verwendeten RNS auszuschließen.
Parallel zur zu testenden RNS-Lösung wurden Eichlösungen (250 - 3 µg/ml; Kalbsthymus-DNS von Serva) mit bekannter DNS-Konzentration aufgearbeitet. Je 220 µl Nucleinsäure-Lösung wurden mit 110 µl 30 %iger Perchlorsäure für 1 h im Wasserbad bei 70°C hydrolisiert. Das Hydrolysat wurde mit demselben Volumen an 4 %-iger Diphenylamin-Lösung in Eisessig und 15 µl Acetaldehyd (1,6 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 30°C inkubiert. (Die Diphenylamin- und Acetaldehyd-Lösung wurden jeweils kurz vor der Durchführung hergestellt.) Die Intensität des im Reaktionsgemisch gebildeten blauen DNS/Farbkomplexes (Clark und Sitzer, 1977) wurde photometrisch bei 595 nm gemessen. Als Vergleichswert diente eine gleichbehandelte Probe ohne Nucleinsäuren. Mit dieser Reaktion ließen sich noch DNS-Konzentrationen von 1 µg/ml nachweisen.

2.3.4. Gelelektrophoretische Auftrennungen

2.3.4.1. Polyacrylamid/Harnstoff-Gel für RNS

Um die Qualität einer RNS-Präparation zu kontrollieren, wurden die nach 2.2.2. - 2.2.4. isolierten RNS-Sorten in einem 3,5 - 4 %igen Polyacrylamid/Harnstoff-Gel aufgetrennt.
Im Wesentlichen erfolgte die Herstellung des für Nucleinsäuren

denaturierenden Gels nach Donis-Keller et al., 1977. Eine 4 %ige Acrylamidlösung (19 : 1 Acrylamid : Bisacrylamid) in TBE-Puffer (89 mM Tris; 89 mM Borat; 2,5 mM EDTA (pH=8,5)) wurde mit 7 M Harnstoff versetzt und mit Ammoniumperoxodisulfat und TEMED (Serva) in einer Vertikalkammer (12 X 12 cm; d=2 mm) polymerisiert. Vor dem Probenauftrag wurden die 3 - 10 µg RNS in einer Lösung mit 80 % (v/v) Formamid; 50 mM Tris-Borat(pH=8,5); 1 mM EDTA für 15 - 30 min bei 60°C denaturiert. Als Elektrophoresepuffer diente der oben erwähnte TBE-Puffer. Der Elektrophoreselauf dauerte bei Zimmertemperatur unter konstanter Spannung von 120 - 250 V 3 - 4 h, wobei als sichtbare Marker Bromphenolblau und Xylen Cyanol (Serva) dienten.
Nach Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml TBE-Puffer) konnte unter UV-Licht die fluoreszierende RNS begutachtet werden.
Eine exakte Molekulargewichtsbestimmung ist in diesem Gelsystem jedoch nicht für alle RNS-Moleküle möglich, da GC-reiche Regionen nach Lehrach et al., 1977 nicht vollständig denaturiert vorliegen.

2.3.4.2. Agarose-Gel mit Glyoxal und DMSO (RNS)

Die Denaturierung der RNS, die Elektrophorese und die anschließende Färbung erfolgten im Wesentlichen nach McMaster and Carmichael, 1977 und Thomas, 1980. Eine 1,5 %ige Agaroselösung in 10 mM Phosphatpuffer (pH=7,0) wurde in eine 2 mm dicke Gelkammer (12 X 12 cm) gegossen. Als Elektrophoresepuffer diente ebenfalls 10 mM Phosphatpuffer, der in großem Volumen vorgegeben und eventuell während der Elekrtophorese erneuert wurde. Vor dem Auftragen der Proben wurden die 6 - 12 µg RNS in 7,5 µl wässriger Lösung mit 7,5 µl 4-fach konzentriertem Probenpuffer und 15 µl DMSO durch 15 min Inkubation bei 60°C denaturiert. (50 µl 4-fach konzentrierter Probenpuffer: 40 µl Glyoxal in 30 %iger wässriger Lösung, das zuvor über den Ionenaustauscher AG-501-X 8; Bio-Rad) auf einem pH-Wert von 6 - 7 gereinigt wurde; 4 µl 0,5 M Phosphatpuffer (pH=7,0); 2 µl 0,1 M EDTA; 4 µl H2O).
Unter konstanter Spannung von 4 - 8 V/cm wurde die RNS über eine Gellänge von ca. 12 cm nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Gefärbt wurde das Gel mit Acridinorange (30 µg/ml) (McMaster und Carmichael, 1977) über 1/2 h

und entfärbt wurde 3 - 5 h unter mehrfachem Wechsel des Phosphatpuffers. Schneller, jedoch schwächer konnte die RNS in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht begutachtet werden.

2.3.4.3. Agarose-Gel mit Formaldehyd für RNS

Für RNS-Molekulargewichtsbestimmungen ist nach Lehrach et al., 1977 das Agarose/Formaldehyd-Gelsystem aus Gründen seiner ausreichend denaturierenden Bedingungen gut geeignet.
Die RNS-Proben wurden durch 15 min Inkubation mit 50 % Formamid und 2,2 M Formaldehyd bei 60°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen der Proben auf Eis erfolgte die Auftrennung in einem 1 - 1,4 %igen Agarosegel mit 2,2 M Formaldehyd (Rave et al., 1979; Maniatis et al., 1982). Höherprozentige, vertikale Agarosegele zerrissen während der Elektrophorese. Nach der Elektrophorese in Mops/Acetat-Puffer (20 mM Morpholinopropansulfonsäure (Serva); 10 mM NaAc; 1 mM EDTA; pH=7,0) wurden die Gele 1 h unter mehrfachem Wechsel in 0,1 M NH4Ac gespült und in Ethidiumbromidlösung gefärbt. Für Hybridisierungen wurde die RNS auf Filter transferiert (s.Kap. 2.7.3.2.).

2.3.4.4. Agarose-Gele für DNS

Die DNS wurde in 1 - 2 %igen Agarosegelen nach Elsevier et al., 1978 aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,04 M Tris-HCl (pH=7,8), 0,02 M NaAc und 2 mM EDTA verwendet. Vor dem Auftragen der Proben wurde die DNS für 3 - 4 min bei 60°C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt und mit 1/5 Vol. Pobenpuffer (0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylen Cyanol, 50 % Glycerin, 0,1 M EDTA) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter konstanter Spannung (U = 2 - 4 V/cm). Als Molekulargewichtsmarker diente die mit den beiden Restriktionsendonucleasen Eco RI und Hind III verdaute DNS des Phagen Lambda.

2.4. Markierungen von RNS und DNS mit P-32

2.4.1. 5'-Endenmarkierung der RNS

Bei dieser Methode wurden mit Hilfe einer Kinase-Reaktion (Novogrodsky et al., 1966) die terminalen 5'-Phosphatgruppen der RNS, die zuvor durch die Alkalische Phosphatase entfernt worden waren, durch radioaktives Phosphat ersetzt.

2.4.1.1. Alkalische Phosphatase-Behandlung und Hydrolyse

Um eine höhere spezifische Aktivität der RNS zu erreichen, wurde die Zahl der 5'-Enden pro µg RNS, an die der P-32-Phosphatrest synthetisiert werden kann (s. Kap. 2.4.1.2.), durch alkalische Hydrolyse erhöht. Die Nucleotidketten mußten jedoch nach der partiellen Hydrolyse noch so lang sein, daß eine spezifische Hybridisierung gewährleistet war.
Alkalische Phosphatase-Behandlung: 20 - 50 µg RNS in 200 µl 10 mM Tris-HCl (pH=8,0) wurden mit 2 - 3 Units Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm; Boehringer/M) versetzt und 30 min bei 45°C inkubiert (Chaconas and Van De Sande, 1980). Mit 30 - 40 µl 100 mM Tris (pH=9,5) wurde der pH-Wert der Lösung auf 9,5 eingestellt und die RNS bei 60°C für 15 min hydrolisiert. Um die Alkalische Phosphatase aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, wurde die Lösung zwei Mal mit Phenol/Chloroform extrahiert und die RNS wurde mit 2,5 Vol. Äthanol bei -20°C über Nacht gefällt.
Die Inaktivierung der Alkal. Phosphatase mit dem Chelatbildner Nitrilotriessigsäure (Chaconas and Van De Sande, 1980) zeigte einen weit geringeren Erfolg als die oben beschriebene Extraktion mit Phenol/Chloroform.

2.4.1.2. Markierungsbedingungen

Folgende Inkubationsbedingungen wurden für die T 4 Polynucleotid-Kinase Reaktion eingehalten: 70 mM Tris-HCl (pH=7,6); 10 mM MgCl2; 5 mM Dithiothreitol. Für eine Markierung von 5 - 10 µg RNS wurden 25 - 50 µCi γ-P-32-ATP (spez. Aktivität: 6.500 Ci/mmol; Amersham) und 5 - 10 Units der

T 4 Polynucleotid-Kinase (BRL) in ein Reaktionsvolumen von 30 µl eingesetzt. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurde nicht markiertes ATP (EK: 2 mM) zugegeben (Simsek et al., 1973) und weitere 10 - 15 min inkubiert. Nachdem das Volumen mit 10 mM Phosphatpuffer (pH=7,0); 0,2 % SDS; 0,1 µg t-RNS/µl auf 100 µl erhöht worden war, konnte die Kinase durch 5 min. Inkubation bei 65°C inaktiviert werden (Chaconas, 1980).
Die Trennung der P-32-markierten RNS von nicht umgesetzten P-32-ATP erfolgte über eine Gel-Chromatographie mit Sephadex-G50-fine durch Zentrifugation (Maniatis et al., 1982). Dazu wurde die Reaktionslösung auf eine mit Sephadex G-50 fine (Pharmacia) gefüllte 1 ml Spritze gegeben und für 5 min bei 1.600 g (4.000 rpm) zentrifugiert. Für die Bestimmung der Einbaurate wurden vom Ausschlußvolumen 2 - 5 µl in 3 ml Szintillatorflüssigkeit (Unisolve I; Zinsser) pipettiert und nach Kühlung der Probe auf 4°C die Zählrate im PACKARD TRI CARB Scintillation Spectrometer gemessen.

2.4.2. Nick-Translation der DNS

Die in den Hybridisierungsexperimenten (s. Kap. 2.7.) eingesetzte P-32-DNS wurde nach Maniatis et al., 1975, radioaktiv markiert. Die Reaktionslösung von 30 µl enthielt je 10 µM dATP, dTTP, dGTP, 10 - 50 µCi α-P-32-dCTP (2.000 - 3.000 Ci/mol; Amersham); 50 mM Tris-HCl (pH=7,6), 5 mM MgCl2, 1 mM DTT, 250 µg/ml BSA, ca. 50 pg DNase I und 0,2 - 1 µg DNS. Nach Zugabe von 8 - 12 Units DNS-Polymerase I wurde bei 12 - 15°C inkubiert. Nach 2 - 3 h wurde die Reaktion analog der Kinase-Reaktion (s. Kap. 2.4.1.2.) abgebrochen und der Aktivitätseinbau bestimmt.
(Experimente mit radioaktiven Substanzen wurden im Isotopenlabor der Universität Tübingen durchgeführt.)

2.5. DNS-Klonierung

Um die Makronucleus-DNS-Stücke, deren Transkriptionsprodukte nach Con A-Behandlung der Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen erscheinen, charakterisieren zu können, waren Anreicherungs-, Klonierungs- und Selektionsschritte nötig.
Die Klonierungs- und Antibiotikaselektionierungs-Schritte der homologen Ma-DNS-Stücke wurden freundlicherweise von Frau Dr. Helftenbein und Frau E. Müller durchgeführt.

2.5.1. Gelelektrophoretische DNS-Anreicherung

Zur Anreicherung der Makronucleus-DNS eines bestimmten Molekulargewichtsbereichs wurde die gesamte Makronucleus-DNS in einem Low-melting-Agarosegel aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker diente auf den beiden äußeren Gelbahnen mitaufgetrennte Lamda-DNS, die zuvor mit den beiden Restriktionsenzymen Eco R I und Hind III geschnitten worden war. Die Elektrophorese erfolgte wie unter Kap. 2.3.4.4. beschrieben, jedoch mit folgenden Abweichungen: Es wurde ein Horizontalgel (18 X 20 cm; d=8 mm) mit 1 oder 1,5 %iger Low-melting-Agarose (BRL) in Elektrophoresepuffer gegossen. Insgesamt wurden in den 12 Geltaschen 300 µg Ma-DNS aufgetragen und unter konstanter Spannung (U = 2 V/cm) über 24 h bei 4°C aufgetrennt. Nach dem Anfärben der DNS mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml in Elektrophoresepuffer) wurden unter UV-Durchlicht anhand des MG-Markers 2 - 5 mm breite Gelstreifen senkrecht zur Auftrennungsstrecke ausgestanzt. (Der selbst gebaute Gelschneider bestand aus zwei dünnen, fixierten Drähten, dessen Abstände im mm-Bereich variiert werden konnten und eine senkrechte Schnittführung ermöglichten.)

2.5.2 Elution der DNS aus dem Gel

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die DNS aus dem Gel-Streifen (s.Kap. 2.5.1.) durch Schmelzen der Low-melting-Agarose und anschließende Phenolextraktion eluiert.
Die bei Wieslander, 1979 beschriebene Methode wurde modifiziert durchgeführt. Die aus dem Gel geschnittenen Stücke wurden kurz mit 0,3 M NaAc-Lösung gespült. Nach dem Dekantieren der Salz-Lösung und Schmelzen des Gelstücks für 5 min bei 65°C wurde zur geschmolzenen Agarose 1 Vol. einer 0,1 M Tris (pH=7,6), 0,5 mM EDTA-Lösung gegeben, die auf 65°C vorgewärmt worden war, und 0,5 - 1 h bei 37°C inkubiert. Nach zweimaliger Phenol-Chloroform Extraktion und Trennung der Phasen durch Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm) wurde die DNS aus der wässrigen Phase mit 2,5 Vol. Äthanol gefällt.

2.5.3. Plasmid-Transformation

Die Fähigkeit einer Bakterienzelle DNS aus dem Inkubationsmedium aufzunehmen, kann durch $CaCl_2$-Behandlung der Zellen erheblich gesteigert werden (Mandel and Higa, 1970).
Aus einer E.coli (HB 101) über Nacht Kultur wurde 1 ml in 50 ml LB-Medium (2.6.1.) überimpft und bis zu einer Zelldichte mit einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,2 inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 1.600 g für 5 min konzentriert. Das Zellpellet wurde in 20 ml 100 mM $CaCl_2$-Lösung aufgenommen und 20 - 25 min auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Nach einer zweiten Zentrifugation (1.600 g; 5 min) wurde das Zellpellet vorsichtig in 500 µl 100 mM $CaCl_2$ suspendiert und über 30 - 36 h im Eisbad inkubiert. Aus dieser mit $CaCl_2$ vorbehandelten Bakterien-Zellsuspension wurden 100 µl zu 10 - 50 ng Plasmid-DNS gegeben, die in 10 µl 10 mM Tris (pH=7,6) gelöst waren. Es folgte eine Inkubation für 10 min auf Eis und eine weitere bei 37°C für 5 min. Die Zellsuspension wurde auf 2 ml LB-Medium pipettiert, das auf 37°C vorgewärmt worden war. Zur Resistenzentwicklung wurden die plasmidhaltigen Zellen in einem Schüttelwasserbad bei 37°C für 60 min inkubiert.

2.5.4. Antibiotika-Selektion

Je 100 µl der transformierten E.coli-Zellsuspension (s.Kap. 2.5.4.) wurden auf kleine Agarplatten (s.Kap. 2.6.1.) mit einem antibiotika-haltigen Selektivmedium ausgestrichen (Maniatis et al., 1982). Dieses Selektivmedium enthielt jeweils das Antibiotikum, dessen Resistenz auf dem Plasmid nach Einbau fremder DNS erhalten blieb. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C waren die Bakterienkolonien zu erkennen. Zur Kontrolle, ob die auf antibiotika-haltigen Selektivmedium gewachsenen Bakterienkolonien das rekombinante Plasmid aufgenommen hatten, wurden sie auf Agarplatten mit einem zweiten antibiotika-haltigen Selektivmedium überstempelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Gen für die zweite Antibiotika-Resistenz wurde beim Einsetzen des fremden DNS-Stücks ins Plasmid zerstört (s.Kap. 2.5.3.) und verhindert daher das Wachstum der E.coli Zellen auf dem zweiten Selektivmedium.
Im Falle vom Ampicillin- und Kanamycin-Selektivmedien wurden je 50 µg Antibiotikum pro ml, bei Tetracyclin 12 µg/ml zugegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die heterologen Histon-Gene transformiert und auf den Antibiotika-Selektionsmedien getestet.

2.6. Plasmidisolierung und Reinigung

2.6.1. Kulturbedingungen für transformierte Bakterien

Als Medium für die Bakterienanzucht diente in allen Fällen LB-Medium mit folgender Zusammensetzung: 0,5 % NaCl, 0,5 % Yeast Extrakt, 1 % Bakto-Trypton, (beide: Difco Laboratories, Detroit; USA) 1 mM $MgSO_4$, 0,1 % Glucose, sowie das jeweilige Antibiotikum (s.Kap. 2.5.5.). Bei der

Verwendung fester Nährmedien wurden 15 g Agar (Serva) pro 1 zugesetzt.
Für die Plasmidisolierung wurden jeweils 10 ml LB-Medium mit 5 µl Bakterien aus Glycerinröhrchen angeimpft und über Nacht im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Aus der 10 ml Bakterienkultur wurde die Plasmid-DNS für Gelhybridisierungen (s.Kap. 2.7.2.) isoliert (Kap. 2.6.3.2.).
Um größere Mengen der Plasmid-DNS in reiner Form anzureichern, wurde eine 10 ml ü.N. Kultur in 1 l LB-Medium überimpft und nach 2.6.2 und 2.6.3 aufgearbeitet.

2.6.2. Plasmidamplifikation

Die beiden zu den hier vorliegenden Untersuchungen benutzten Plasmide, pBR 322 und pCR 1, besitzen das Replicon Col E 1, relaxed. Dieses Replicon ermöglicht eine höhere Plasmidausbeute durch seine selektive DNS-Amplifikation, nachdem durch das Antibiotikum Chloramphenicol die zelluläre Proteinsynthese inhibiert hat und als Folge die Replikation des Bakterienchromosoms eingestellt wird (Clewell, 1972).
Die nach Kap. 2.6.1. angeimpfte 1 l Bakterienkultur wuchs bis zu einer Zelldichte entsprechend einer OD 600 nm von 0,4 - 0,6. Dann wurden 180 µg Chloramphenicol pro ml Medium (Stammlösung: 34 mg/ml in Äthanol) zu den Zellen pipettiert und wie zuvor für weitere 12 - 16 h inkubiert.

2.6.3. Bakterienlyse und Plasmidisolierung

Die Plasmid-DNS wurde nach einer modifizierten Methode nach Birnboim and Doly, 1979 isoliert. Die Zahlenwerte in Klammern* geben die Werte für eine Plasmid-Isolierung aus einer 10 ml Kultur an.
Eine 1 l (*10 ml) Kultur plasmidhaltiger Bakterien (s.Kap. 2.6.2.) wurde bei 5.000 rpm für 15 (*5) min abzentrifugiert (Hermle Zentrifuge ZK; Rotor A 6.14). Das Pellet wurde in 25 (*2) ml Lysozymlösung (2 mg/ml Lysozym; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mMTris, pH=8,0) suspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 50 (*4) ml alkalischer SDS-Lösung (0,2 N NaOH; 1 % SDS) wurde leicht geschüttelt und die Suspension weitere 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden 37,5 (*3) ml 3 M NaAc; pH=4,8 zugegeben, vorsichtig durchmischt und bei 4°C weitere 60 min inkubiert. Die

Zelltrümmer mit dem Bakterienchromosom wurden bei 10.000 rpm für 45 min abzentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde bei -70°C für 2 h nach Zugabe von 2 Vol. kaltem Äthanol gefällt. Die Plasmid-DNS wurde bei 10.000 rpm für 45 min abzentrifugiert und das Pellet in 25 (*1,8) ml 50 mM Tris; pH=8,0; 0,1 M NaAc resuspendiert. Nach einer weiteren Fällung in Äthanol wurde die DNS in 15,8 (*0,1) ml TE-Puffer aufgenommen. Die Plasmid-DNS wurde anschließend über einen CsCl-Gradienten gereinigt (s.Kap. 2.6.4.).

2.6.4. Reinigung der Plasmid-DNS

Die nach Kap. 2.6.3. angereicherte Plasmid-DNS wurde nach dem Prinzip eines gefärbten Gleichgewicht-Dichtegradienten in ethidiumbromidhaltiger CsCl-Lösung (Radloff et al., 1967) gereinigt.
Dazu wurde zu der in 15,8 ml TE-Puffer gelösten Substanz 17 g CsCl und 700 µl einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in A.bidest.) gegeben. Die CsCl-Dichte wurde anhand des Brechungsindex kontrolliert und gegebenenfalls auf n = 1,30 - 1,36 korrigiert. Nach einer 36 - 48stündigen Zentrifugation (Ultrazentrifuge Beckmann L5.65) bei 20°C mit 33.000 rpm im Ti 60-Rotor trennten sich Nucleinsäuren und Proteine. Unter UV-Licht (Hanau Quarzlampe; Typ S215) konnten durch die Polyallomer-Röhrchen (Beckmann) die fluoreszierenden Nucleinsäurebanden lokalisiert werden. Während die Bakterien-RNS pelletierte, bildeten genickte, zirkuläre und lineare Plasmid-DNS bei niedrigerer CsCl-Dichte eine Bande als die Supercoil-Konformation der Plasmid-DNS. Die letztere wurde mit einer Spritze abgezogen. Um das Ethidiumbromid aus der Plasmid-DNS-Lösung zu entfernen, wurde 4 - 5 mal mit dem gleichen Volumen Iso-Amylalkohol extrahiert. Nach Zugabe von 2 Vol. TE-Puffer konnte die Plasmid-DNS mit 2,5 Vol. Äthanol gefällt werden, ohne daß CsCl mit ausfiel.

2.7. Hybridisierungsexperimente

2.7.1. Koloniefilterhybridisierung

Die Koloniefilterhybridisierung ermöglicht ein schnelles Auswählen der Bakterienkolonien mit den gesuchten, rekombinanten Plasmiden aus einer Vielzahl von Klonen, die nach einem Klonierungsexperiment (s.Kap. 2.5.) anfallen. In dem hier durchgeführten Experiment wurde mit P-32-markierter RNS (Kap. 2.4.1.) aus verschiedenen Zellstadien nach Con A-Behandlung (2.1.2.) auf die DNS lysierter Bakterienkolonien hybridisiert.
Die Koloniefilterhybridisierung wurde von Grun stein and Hogness, 1975, entwickelt und von verschiedenen Autoren u.a. Grun stein and Wallis, 1979, modifiziert. Die zu testenden Bakterienklone wurden von Mikrotiterplatten (je 96 Klone/Platte) auf Nitrocellulose-Filter (Schleicher und Schüll; BA 85) unter sterilen Bedingungen überstempelt. Die NC-Filter wurden zuvor 5 min in LB-Medium, 5 min in A.bidest. gekocht und zwischen 3 MM Whatmann Chromatographie-Papier 30 min bei 110°C autoklaviert. Danach wurden die Filter luftblasenfrei auf Agarplatten (s.Kap. 2.6.1.) gelegt. Die überimpften Bakterien wurden 12 - 36 h bei 37°C inkubiert bis sich deutliche Kolonien zeigten. Die anschließende Zellyse, DNS-Denaturierung, sowie die Neutralisierung der Filter wurde auf einem Vakuum Geltrockner (Schütt, Göttingen) durchgeführt. Dieser ermöglichte ein schnelles Absaugen der Lösungen und Trocknen der Filter. Die bewachsenen Filter wurden dann über 2 Stück 3 MM Whatmann Papier, die zuvor in Denaturierungslösung (0,5 N NaOH) getränkt waren, gelegt und mit weiterer 0,5 N NaOH-Lösung beträufelt. Nach einer Einwirkungszeit von 5 min wurde die Lösung abgesaugt. Analog dem Denaturierungsschritt wurde die Neutralisierung mit 0,5 M Tris (pH=7,6) und 1,5 M NaCl zweimal durchgeführt. Im Anschluß wurden die Filter mit Chloroform durchgesaugt, zwischen trockenes Whatmann Papier gepresst und bei 80°C unter Vakuum für 2 h gebacken. An der jeweiligen Koloniewachstumsstelle auf dem NC-Filter war jetzt die DNS fixiert. Durch Vorhybridisierung (s.Kap.2.7.4.) wurden unspezifische Bindungsstellen der fixierten Nucleinsäuren vor der Hybridisierung mit der radioaktiven RNS-Probe abgesättigt.

2.7.2. Gelhybridisierungen

Für die Hybridisierungen mit fixierter DNS, die ein Molekulargewicht größer als 1 kbp besaß, wurde eine Methode herangezogen, die eine Hybridisierung im Gel, also ohne Transfer auf Filter ermöglichte (Shinnick et al., 1975). Die DNS-Agarose-Gele wurden zwischen 3 MM Whatmann Papier mit Hilfe eines Vakuum Geltrockners (Schütt, Göttingen) bei 45°C getrocknet. Vor dem Hybridisierungsansatz wurden die Gele in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 150 mM NaCl) für 20 min bei Zimmertemperatur geschüttelt und anschließend über die gleiche Zeit neutralisiert (Neutralisierungspuffer: 0,5 M Tris (pH=7,6), 150 mM NaCl). Alle weiteren Schritte (Vorhybridisierung, Hybridisierung) wurden wie unter Kap. 2.7.4. beschrieben durchgeführt.

2.7.3. Filterhybridisierung

2.7.3.1. Dot-Hybridisierung

Diese Hybridisierungmethode ermöglicht eine Bestimmung relativer Nucleinsäurekonzentrationen aus einer Mischpopulation, wie z.B. die relative Häufigkeit einer bestimmten m-RNS in der cytoplasmatischen RNS.

2.7.3.1.1. mit fixierter DNS

Für die Bestimmung relativer Sequenzhäufigkeiten wurden klonierte und denaturierte Plasmide mit Insert in definierter Menge auf Filter fixiert. Die Filter wurden dann unter Hybridisierungsbedingungen (s.Kap. 2.7.4.) mit radioaktiv markierter RNS (Kap. 2.4.1.) inkubiert.
Vor dem Auftragen der DNS-Proben auf die Filter (NC-Filter; Schleicher und Schüll (0,45 µm) oder Biodyne A Nylon-Membranen (PALL Ultrafine Filtration Coop.) wurde die in TE-Puffer gelöste DNS durch 1 Vol. 0,5 N NaOH bei Zimmertemperatur denaturiert. Nach 20 min wurde 1/2 Vol. Neutralisierungspuffer (1 M Tris (pH=7,6), 150 mM NaCl) zupipettiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt und mit Hilfe eines Minifold (Schleicher und Schüll) auf die Filter getüpfelt. Auf die vorgegebenen abgegrenzten Kreisflächen von 0,32 cm wurden 4 - 6 µg Plasmid-DNS in 10 µl aufgetragen.

Die maximale Bindungskapazität wurde mit 1 µg/mm (Kafatos et al., 1979) angegeben.
Jeweils vor und nach dem Auftragen der DNS wurde das Filter mit 1 M NH4Ac gespült, um eine effektivere DNS-Bindung zu erzielen (Kafatos et al., 1979). Nachdem das Filter unter Vakuum getrocknet war, wurde es 2 h bei 80°C gebacken.

2.7.3.2. mit fixierter RNS

Im Hybridisierungsexperiment mit fixierter RNS und markierter DNS (s.Kap. 2.4.2.) läßt sich die relative Häufigkeit des klonierten Gens in der RNS-Population bestimmen.
Da schon geringste DNS-Spuren in einer RNS-Probe zu verfälschten Ergebnissen geführt hätten, wurde jede RNS-Probe vor dem Fixieren auf Filter einem DNase I-Verdau unterzogen (100 µg DNase/ml, RNase frei [BRL], 20 min, 25°C, in 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl2, 10 mM Tris (pH=7,6)). Bevor die RNS auf das Filter aufgetragen werden konnte, mußte sie denaturiert werden. Die Denaturierung konnte mit zwei verschiedenen Methoden erreicht werden:
Die erste Methode folgte im Wesentlichen nach Thomas, 1983. Hier wurde die Denaturierung der RNS durch Inkubation in 1 M Glyoxal, pH = 5 - 6, bei 50°C und 1 h erreicht. Nach dem Fixieren der RNS auf den Biodyne A-Filtern (analog Kap. 2.7.3.1.) wurde vor der Hybridisierung das Glyoxal durch Inkubation der Filter in 20 mM Tris (pH=8,0) für 5 min bei 90 - 100°C entfernt.
Nach der zweiten und erfolgreicheren Methode wurde die RNS in Anwesenheit von Formaldehyd denaturiert (White and Bancroft, 1982). Pro Dot wurden 15 - 25 µg RNS in 5 µl 10 mM Tris (pH=7,6) mit 3 µl 20 X SSC und 2 µl 37 % (w/w) Formaldehyd versetzt und bei 60°C für 15 min inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden je 10 µl auf die Filter pipettiert (analog Kap. 2.7.3.1.).

2.7.3.2. Gel - Filter - Transfer von Nucleinsäuren

2.7.3.2.1. SOUTHERN - Transfer für DNS

Der Transfer der auf Agarosegelen aufgetrennten DNS auf Biodyne A-Filter wurde nach Southern, 1975, durchgeführt. Für Hybridisierungen wurde die DNS nur in den Fällen vom Gel auf Filter transferiert, in denen die DNS-Stücke kleiner als 1 kbp waren. Diese kleinen DNS-Stücke wären bei der normalerweise durchgeführten Gelhybidisierung (2.7.2.) leicht aus dem Gel diffundiert. Vor dem Transfer wurde die DNS im Gel 20 min in 0,5 M NaOH und 0,15 M NaCl denaturiert und 20 min in 1 M Tris (pH=7,6) und 0,15 M NaCl neutralisiert.

2.7.3.2.2. NORTHERN - Transfer für RNS

Für Hybridisierungen wurde die denaturierte und anschließend gelelektrophretisch aufgetrennte RNS (s.Kap. 2.3.4.2 und 2.3.4.3) nach dem Prinzip des Southern-Transfers auf Biodyne A-Filter fixiert. Der Transfer erfolgte über 12 - 14 h in 20 X SSC bei 4°C. Nachdem die Filter 1/2 h unter Vakuum getrocknet waren, wurden sie für 1 - 2 h bei 80°C gebacken.

2.7.4. Hybridisierungsbedingungen

Die Hybridisierungen wurden im Wesentlichen nach der bei Elsevier et al., 1978 beschriebenen Methode der DNS/DNS-Hybridisierung durchgeführt. Da jedoch RNS/DNS-Hybride weniger stabil sind, wurden für diese Hybridisierung die Bedingungen wie folgt geändert: - die Inkubationstemperatur wurde von 65°C auf 60°C gesenkt. - Die Salzkonzentration wurde von 2 X SSC auf 5 X SSC erhöht.
Die Filter (2.7.1. und 2.7.3.) und die Gele (2.7.2.) wurden 2 - 6 h in einer Lösung vorhybridisiert, die wie folgt zusammengesetzt war: 10 X Denhard's Lösung* (Denhard, 1966), 5 X SSC, 0,1 % SDS und je ml 100 µg t-RNS (aus Bierhefe), 100µg beschallte, einsträngige E.coli-DNS. Um Nuclease-Aktivitäten in der Lösung zu zerstören, wurde vor SDS- und Nucleinsäure-Zugabe die Hybridisierungslösung mit 1/1.000 Vol. DEP je 2 h

bei Zimmertemperatur und anschließend bei 70 - 75°C gerührt. Nach Zugabe der radioaktiven und hitzedenaturierten RNS- und DNS-Probe wurde 30 - 60 h bei 60°C inkubiert. Gewaschen wurden Gele und Filter in 4 X SSC und 0,2 % SDS über 1,5 - 4 h bei 55°C und anschließend bei ca. 50°C getrocknet. * (10 X Denhard's: 0,2 % (w/v) Ficoll (Pharmacia), 0,2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (Serva), 0,2 % (w/v) Rinderserumalbumin (Serva)).

2.7.5. Autoradiographie

Der Röntgenfilm (Kodak X-OmatS) wurde mit einem abgeschwächten Lichtblitz sensitiviert (Laskey, 1975) und zwischen Hybridisierungsprobe und Röntgenverstäkerfolie (Cronex Quanta III, Siemens) gelegt. Während der Expositionszeit wurden die Kassetten bei -70°C aufbewahrt.

2.8. Verdau von DNS mit Nucleasen

2.8.1. DNS-Fragmentierung mit Restriktionsenzymen

Die enzymatische Spaltung der DNS durch Restriktionsendonucleasen wurde in Puffersystemen nach Angabe der jeweiligen Vertriebsfirmen der Enzyme durchgeführt. Pro µg DNS wurden 2 - 4 Enzymeinheiten eingesetzt und jeweils bei 37°C für 2 h inkubiert. Durch Zugabe von EDTA (EK: 5 mM) und Inkubation bei 60 - 65°C für 5 min wurden die Nucleasen denaturiert. Wurde die verdaute DNS nicht sofort gelelektrophoretisch aufgetrennt, so wurde SDS (EK: 0,1 %) zugegeben und die DNS mit 2,5 Vol. Äthanol gefällt.

2.9. Proteinuntersuchungen

2.9.1 In-vivo-Markierung der Proteine

Für die Markierung der Gesamt-Zell Proteine wurden Zellen aus 2 - 6 Kulturschalen mit einer Gaze (90 µm Maschenweite) gereinigt, auf einer 25 µm-Gaze gesammelt und mit 5 ml Pringsheim-Lösung in eine kleine Petrischale gespült. Für die Kern-Protein-Markierung wurde von der 3-fachen

Zellmenge ausgegangen. Zu je 5 ml einer solchen Zellkultur wurden ca. 5×10^{-15} mol L-(S-35)-Methionin (1070 Curie/mmol; Amersham) mit einer Gesamtaktivität von 35 - 50 µCi gegeben.

2.9.2. Proteinaufarbeitung

2.9.2.1. Gesamt-Proteine

Nach einem Markierungsintervall von 10 min wurden die Zellen 3 - 4 min bei 700 rpm (40 g) zentrifugiert. Das überstehende Kulturmedium wurde abpipettiert und 20 µl des Zellkonzentrats mit 1 Vol. heißem SDS-Probenpuffer (King, 1971) (s.Kap. 2.9.3.1) versetzt, gut durchmischt und 5 min bei 80 - 90°C erhitzt. Im Bedarfsfall wurden die Proben bei -20°C gelagert und nach Kap. 2.10.3. und 2.10.8. aufgearbeitet. Die restlichen konzentrierten Zellen, 30 - 50 µl, wurden in je 1 Vol. SDS-haltigem Lysiermedium (O'Farrell et al., 1977) aufgenommen und nach 10 min mit 1 Vol. Lysiermedium A (O'Farrell, 1975) (s.Kap. 2.10.4.) versetzt. Diese Proben konnten ebenfalls bei -20°C gelagert werden und wurden dann im zwei-dimensionalen Gel aufgetrennt (2.10.4.).

2.9.2.2. Kern-Proteine

Nach 15 min Gesamt-Protein-Markierung (Kap. 2.9.1.) wurde zu der Zellkultur ein ca. 10.000-facher Überschuß an nichtmarkiertem L-Methionin gegeben. Nach weiteren 20 min wurden die Zellkerne nach Kap. 2.2.1. isoliert. Ein Teil der Kerne wurde einem DNase-Verdau unterzogen, der andere Teil wurde unmittelbar nach Anreicherung der Kerne in SDS-Probenpuffer (2.9.2.1.) lysiert.

2.9.3. Ein-dimensionale Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels einer Disk-Elektrophorese (Laemmli, 1970). Dabei wurden die aufgetragenen Proteine im Verlauf des Sammelgels nach dem Prinzip der Isotachophorese auf eine scharfe Probenfront konzentriert. Die anschließende Trennung im engmaschigeren

Trenngel erfolgte im Wesentlichen nach dem Molekulargewicht.
Das Reaktionsgemisch für das Sammelgel enthielt 5 % Acrylamid (0,13 % Bisacrylamid), das Trenngel bestand aus einem Gradienten von 7,5 - 17,5 % Acrylamid (0,2 - 0,46 % Bisacrylamid) oder 12,5 % Acrylamid. Die Länge des Trenngels betrug 12 cm, die des Sammelgels 5 cm bei einer Geldicke von 1 mm. Der Elektrodenpuffer bestand aus 25 mM Tris, 0,192 M Glycin (pH=8,3) und 0,1 % SDS. Um in einem Gel pro Bahn vergleichbare Radioaktivitätsmengen auftragen zukönnen, wurde pro SDS-Zellysat ein Aliquot von 2 µl entnommen, mit dem Gewebelöser Helminth 30 min bei 50°C inkubiert, und die Zählrate mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve I, Zinsser) bestimmt. Zwischen 3,5 - 10 µl des SDS-Zellysats wurden auf das Gel gegeben, wobei die kleineren Mengen mit SDS-Probenpuffer ausgeglichen wurden. Die Elektrophorese dauerte bei einer konstanten Spannung von U = 10 V/cm 4 - 6 h.

2.9.4. Zwei-dimensionale Gelelektrophorese

Mit Hilfe der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer Koordinate entsprechend ihrem Isoelektrischen Punkt, in der dazu senkrechten nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Durchführung erfolgte im Wesentlichen nach O'Farrell, 1975 und O'Farrell et al., 1977. Die veränderte Maschenweite des IEF-Gels nach Garrels, 1983, ermöglichte auch die Identifizierung hochmolekularer Proteine.
In Plastikröhrchen (h = 13 cm; $\varnothing$ = 2,5 mm) wurde das Polyacrylamidgel folgender Zusammensetzung gegossen: 5,5 g Harnstoff; 1 ml 28,38 % (w/w) Acrylamid (1,62 % (w/w) Bisacrylamid); 2 ml 10 % (w/v) Nonidet P-40 in H2O; 2,3 ml H2O; 0,5 ml 40 % Ampholine (je nach pH-Bereich); 10 µl 10 % AS und 7 µl TEMED. Die weitere Vorbereitung des Gels und die eigentliche Isoelektrophoretische Fokussierung erfolgte nach O'Farrell, 1975.
Für die Bestimmung des pH-Gradienten der IEF-Gele wurde ein parallel gelaufenes Gel in 0,5 cm lange Stücke geschnitten. Die Gelstück wurden in je 1 ml Wasser 1 h geschüttelt, und mit einer Glaselektrode wurde der pH-Wert bestimmt. Für die Trennung in der zweiten Dimension wurde als Trenngel ein 12,5 %iges Polyacrylamidgel (d = 1 mm) analog Kap. 2.9.3. verwendet. Die 2 h in SDS-Probenpuffer äquilibrierten Rundgele wurden mit

0,7 %iger Agarose (in SDS-Probenpuffer) mit dem Sammelgel verbunden, und die Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (s.Kap. 2.9.3.).

2.9.5. Proteinfärbungen

2.9.5.1. mit Coomassie blue

Zur Fixierung der Proteine wurde das Gel 1 h in einer Lösung mit 10 % TCA, 10 % HAc und 10 % Methanol äquilibriert. In Coomassie blue-Lösung (0,25 % Coomassie-brillant blue G 50, 90,8 % Methanol/H2O (1:1), 9,2 % Eisessig) wurde das Gel 30 min gefärbt. Entfärbt wurde das Gel unter mehrmaligem Wechsel in 7,5 %iger Essigsäure-Lösung. Eine schnellere Entfärbung konnte mit 10 % HAc und 30 % Methanol erreicht werden.

2.9.5.2. mit Silber

Die Silberfärbung für Proteine zeichnet sich durch eine ca. 100-fach höhere Sensitivität gegenüber den Färbungen mit organischen Stoffen wie z.B. Coomassie blue aus.
Die Proteine im Polyacrylamidgel (s.Kap. 2.9.4.) wurden in 10 % TCA und 35 % Methanol 20 min denaturiert. Die Gele wurden dann je 20 min drei Mal in 200 ml 35 % Methanol, 10 % HAc und zwei Mal in 200 ml 50 % Methanol gespült. In Silber-Lösung wurden sie für 45 - 60 min äquilibriert. (kurz vor Gebrauch angesetzte Silber-Lösung: 1,5 g AgNO3, 116 ml H2O, 2,65 ml NH3 (33 %), 4,5 ml NaOH (1 N), 120 ml Methanol.) Die Dauer des anschließenden Wässerns - unter mehrfachen Wechsel des destillierten Wassers - hing von der Geldicke ab und lag für 1 mm Gele bei 10 min. In frisch angesetztem Entwickler (50 mg Citrat x 1 H2O und 0,5 ml (37 %) Formaldehyd in 1 l A.bidest.) wurde das Gel 4 - 20 min leicht geschüttelt und dann 5 - 10 min in Fixierlösung (12 g Na-thiosulfat in 200 ml 50 % Methanol) gelegt.

2.9.6. Fluorographie

Die Polyacrylamidgele wurden nach Bonner and Laskey, 1974 mit DMSO und PPO/DMSO äquilibriert. Nach dem Wässern wurden die Gele bei 80 - 90°C 1 h auf einem Geltrockner (Schütt, Göttingen) getrocknet. Die Fluorogaphie mit einem Enhancer (NEN) war weniger erfolgreich, da die Autoradiographie stark verbreiterte Banden zeigte.

2.9.7. Immunenzymatischer Nachweis der Tubulin-Proteine

Um in einem ein- und zwei-dimensional aufgetrennten Gesamtproteinmuster von Stylonychia lemnae die Tubulin-Proteine zu identifizieren, wurden die auf Filter transferierten Proteine einer Antigen-Antikörper-Reaktion und anschließenden Peroxidase-Farbreaktion unterzogen. Diese Methode wurde nach Stick (persönl. Mitteilung), Towbin et al., 1979 und Burnette, 1981, durchgeführt.
Nach einer 1 D und 2 D Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel (s.Kap. 2.9.3. und 2.9.4.) wurden die renaturierten Proteine (1,5 h in 3 X 200 ml 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 4 M Harnstoff, 0,1 M DTT, 10 mM Tris-HCl (pH=7,0)) auf Nitrocellulose- (Schleicher und Schüll) oder Biodyne A-Membranen transferiert. Nach dem 4-stündigen Elektrotransfer bei U = 30 V, 4°C in 25 mM Tris und 0,192 M Glycin (pH=8,3) wurden die Filter 30 min in PBS-Lösung mit 0,1 % BSA und 0,05 % Triton X-100 und dann kurz in PBS gespült. (PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM KH2PO4, 6 mM Na2HPO4 (pH=7,1))
Um eine unspezifische Antikörperadsorption auf den Filtern zu reduzieren, wurden NC-Filter für 4 - 5 h in PBS-Lösung mit 1 % BSA bei Zimmertemperatur bzw. Biodyne A-Membranen 12 h in PBS-Lösung mit 10 % BSA bei 50°C (Gershoni und Palade, 1983) inkubiert. Das Tubulin-Antikörper-Serum(*1) wurde in PBS-Lösung mit 0,1 % BSA 200-fach verdünnt und die Filter über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Filter wurden 4 mal für je 15 min in PBS und 0,1 % Triton X-100 und ein Mal kurz in PBS gewaschen und dann 1 h mit 100-fach verdünntem Swine-Anti-Rabbit- oder Goat-Anti-Rabbit-Serum (DAKO Immunglobulins) inkubiert. Nach einer weiteren Waschung der Filter nach dem gleichen Verfahren wie oben beschrieben, folgte eine 1 - 2stündige Inkubation mit 250-fach in PBS-Lösung mit 0,1 % BSA verdünntem

Peroxidase-Anti-Peroxidase (Rabbit) (DAKO Immunglobulins). Die Filter wurden wieder wie oben beschrieben gewaschen und anschließend bei 37°C in 0,5 mg 4-Chloro-1-Naphtol (Sigma) pro ml, 0,012 % H_2O_2, 80 mM Tris (pH=7,6) 5 - 20 min entwickelt. Beendet wurde die Farbreaktion, indem die Filter in eiskaltes Wasser überführt wurden.

---

* Das Tubulin-Antikörper-Serum wurde freundlicherweise von Dr. A. Adoutte, Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur Yvette, Frankreich zur Verfügung gestellt.

2.10. Versuche zur Translation der RNS

2.10.1. In vitro-Translation im Reticulocyten-System

Das Kaninchen-Reticulocyten-Lysat (Amersham-Buchler) war nach der Methode von Pelham and Jackson, 1976, präpariert und enthielt bereits alle zur Proteinsynthese notwendigen Substanzen, ausgenommen die radioaktiv markierte Aminosäure und die zu testende RNS. Je 10 µl Reticulocyten-Lysat wurden mit 25 µCi S-35-Methionin (ca. 1.070 Ci/mmol; Amersham) und 0,5 - 20 µg RNS bei 30°C für 1 h inkubiert. Die zu testende RNS war nach verschiedenen Methoden (s.Kap. 2.2.2. - 2.2.3.) präpariert. Die Kontrollansätze enthielten anstelle der RNS aus Stylonychia TMV-RNS bzw. Wasser.

2.10.2. In-vivo-Translation nach Injektion in Xenopus-Oocyten

Die Mikroinjektion der RNS in Xenopus laevis Oocyten wurde nach Beck et al., 1984, durchgeführt.
Nach Inkubation der injizierten Oocyten für 48 h bei Zimmertemperatur wurden die Proteine des Inkubationsüberstandes und der Oocyten getrennt aufgearbeitet (analog Kap. 2.9.3.).

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung der RNS für die zeitabhängige Konzentrationsmessungen spezifischer m-RNS nach Conanavalin A-Behandlung

Hinweise, daß nach Con A-Behandlung die Zelle für die Pellicularegeneration spezifische RNS-Sequenzen neu oder vermehrt synthetisiert, zeigen die Translationsversuche mit homologer RNS, die in die Ciliatenzelle injiziert wurde (Knowles et al., 1978). Außerdem hatten Lipps und Bessler, 1977, einen verstärkten H-3-Uridin-Einbau gemessen, der als Folge der Con A-Behandlung nach 30 min und bis zu einem Maximum nach 60 min anstieg. Die hier zunächst durchgeführte gelelektrophoretische Analyse der cytoplasmatischen RNS aus Kontroll-Zellen und aus Zellen nach 30 und 60 min Con A-Behandlung zeigen relativ schwache Bandenunterschiede (siehe Abbildung 1).

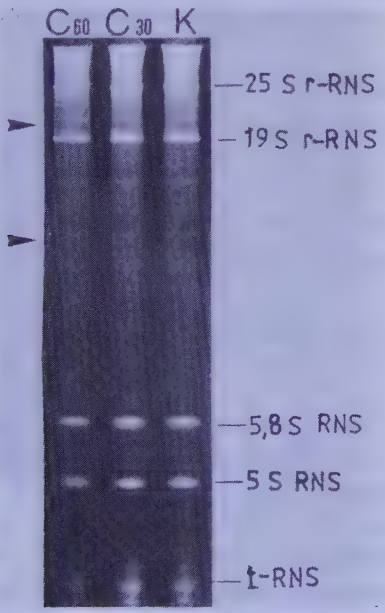


Abbildung 1: Cytoplasmatische RNS aus Kontroll-Zellen (K) und aus Zellen nach 30 (C30) und 60 min (C60) Con A-Behandlung wurden nach Denaturierung im 3,5 %igen Polyacrylamid/7 M Harnstoff – Gel (s.Kap. 2.3.4.1.) aufgetrennt, Ethidiumbromidgefärbung.
25 S r-RNS: 3,13 Kb; 19 S r-RNS: 1,62 Kb; 5,8 S r-RNS; 5 S r-RNS; t-RNS: 70 - 85 Basen.

Für weitere vergleichende RNS-Analysen wurde die m-RNS (s.Kap. 2.2.4.) aus Kontroll-Zellen und aus Zellen nach 15, 30, 45, 70 und 140 min Con A-Behandlung isoliert. Sowohl hier als auch bei der Isolierung von Kern-RNS, die nach 15, 45 und 70 min Con A-Zugabe durchgeführt wurde, wurde darauf geachtet, daß sich zum Zeitpunkt der Isolierung kein Chlorogonium-Futter in den Kulturen befand. Für Experimente zur Messung der RNS-Konzentrationskinetiken wurden nur Zellen eines Klons von Stylonychia lemnae herangezogen, die möglichst innerhalb einiger Stunden aufgearbeitet worden waren.

3.2. Isolierung der an der Regulation beteiligten Gen-großen Ma-DNS-Stücke

Die Selektionierung der Ma-DNS-Sequenzen, deren Transkriptionsprodukte (Kern- und m-RNS) zeitabhängige Konzentrationsunterschiede nach Behandlung der Zellen mit Concanavalin A zeigen, erfolgte über mehrere eingrenzende Experimente.
Nach der gelelektrophoretischen Anreicherung von Ma-DNS-Stücken bestimmter Molekulargewichtsbereiche (Kap. 2.5.1. und 2.5.2.) wurden diese Ma-DNS-Stücke mit Hilfe des Vektors pBR 322 in E.coli kloniert (Kap. 2.5.3. - 2.5.4.). Aus den ca. 500 Bakterienklone mit verschiedenen Ma-DNS-Inserts im Plasmid konnte die Zahl der interessierenden Klone durch eine Reihe von Hybridisierungsexperimenten stufenweise eingeengt werden.

3.2.1. Molekulargewichtsbestimmung der interessierenden Gen-großen Ma-DNS-Stücke

Die DNS im Makronucleus von Stylonychia lemnae liegt in Gen-großen Stücken vor, die innerhalb einer DNS-Länge von 0,45 - 25 Kilobasenpaaren (kbp) liegen (Lipps und Steinbrück, 1978).
Um aus dieser Ma-DNS Gene isolieren zu können, deren m-RNS infolge der Con A-Behandlung in erhöhtem Umfang in der Zelle erscheint und sehr wahrscheinlich an der Pellicularegeneration beteiligt ist (Knowles et al., 1978, Nock, 1979), mußte zunächst das Molekulargewicht der entsprechenden Ma-DNS-Stücke besimmt werden.

Hierzu wurden Ma-DNS und MG-Marker (Lambda-DNS, Eco R I/Hind III verdaut) auf einem 1,4 %igen Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Abbildung 2a) und jeweils mit P-32-markierter m-RNS aus normalen und stimulierten (45 min) Zellen hybridisiert (s.Kap. 2.7.2.).
Die Autoradiographie in Abbildung 2 b zeigt verstärkte Banden nach P-32-RNS/DNS-Hybridisierung als Folge spezifischer m-RNS-Erhöhung nach 45 min Con A-Behandlung im Molekulargewichtsbereich von 1,8, 2,1 und 3,6 Kbp.

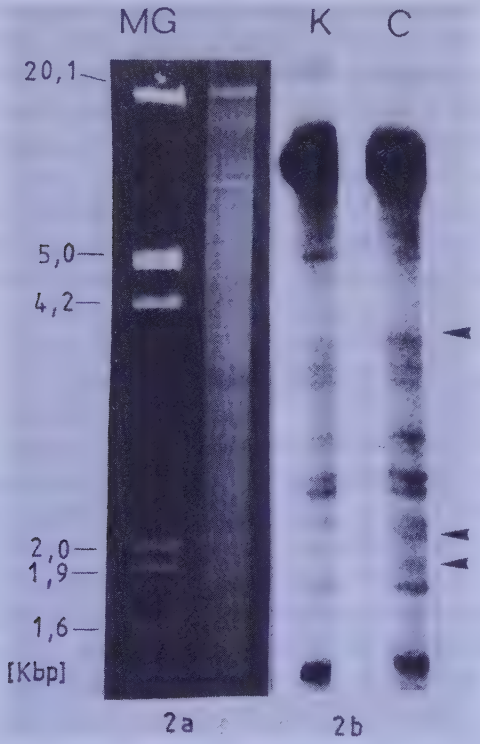


Abbildung 2a: Ma-DNS im 1,4 %igen Agarose Gel aufgetrennt (Kap. 2.3.4.4.), Ethidiumbromidfärbung.
MG-Marker: Lambda-DNS, Eco R I/Hind III verdaut.

Abbildung 2b: Die Autoradiographien nach P-32-m-RNS/Ma-DNS-Hybridisierung zeigen verstärkte Banden als Folge der Con A-Behandlung.
K) Hybridisierung mit m-RNS aus Kontroll-Zellen.
C) Hybridisierung mit m-RNS aus 45 min Con A-Zellen.

3.2.2. Anreicherung und Klonierung von Ma-DNS-Stücken eines definierten Molekulargewichtsbereichs

Für die Anreicherung von Ma-DNS bestimmter Molekulargewichtsbereiche wurde die Ma-DNS im Agarose-Gel (s.Kap. 2.5.1.) aufgetrennt, nach Ethidiumbromidfärbung ein ca. 3 mm breiter Gelstreifen anhand des MG-Markers (Lambda-DNS, Eco R I, Hind III verdaut) ausgestanzt, und die Ma-DNS-Stücke aus dem Gelstreifen eluiert (s.Kap. 2.5.2.). Die auf diese Weise angereicherte Ma-DNS bestand jedoch noch aus einigen hundert verschiedenen Ma-DNS-Genstücken, wenn man davon ausgeht, daß der Ciliat ca. 10.000 - 15.000 verschiedene Gene besitzt (Ammermann et al., 1974; Nock, 1981) und eine Anreicherung der Ma-DNS eines definierten Molekulargewichtsbereichs um den Faktor 60 (Auftrennungsstrecke 18 cm, ausgestanztes Gelstück ca. 3 mm) erreicht wurde.

Die Grundlage für eine weitere Selektionierung und Charakterisierung der an der Regulation beteiligten Ma-DNS-Genstücke war deren Klonierung mit Hilfe des Vektors pBR 322 in E.coli (s.Kap. 2.5.3. - 2.5.4.).

3.2.3. Selektionierung der klonierten Ma-DNS-Genstücke

Die an der Regulation beteiligten Ma-DNS-Genstücke wurden durch stufenweises Austesten der klonierten Ma-DNS-Stücke isoliert. Ob Ma-DNS-Gene relative Unterschiede in ihrer transkribierten RNS-Menge vor und nach Con A-Behandlung aufweisen, wurde durch Vergleich der Schwärzungsgrade auf den Autoradiographien nach P-32-RNS/DNS-Hybridisierung (s.Kap. 2.7.) aufgedeckt. Als radioaktiv markierte Hybridisierungsprobe wurde jeweils Kern- und m-RNS aus Kontroll-Zellen und Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Con A-Behandlung (s.Kap. 3.1.) eingesetzt.

3.2.3.1. Koloniefilterhybridisierung der transformierten Insert-Plasmid-DNS mit markierter P-32-RNS

Um die ca. 500 erhaltenen Klone (s.Kap. 3.2.2.) auf den Einbau der interessierenden Gene hin zu überprüfen, wurde zunächst jeweils mit verschiedenen P-32-markierten RNS-Sorten (Kap. 3.1.1. und 2.4.) gegen die auf Nitrocellulose-Filter übertragene Ma-DNS-Klonbank hybridisiert (s.Kap. 2.7.1.). Bei diesem Experiment stand dem Vorteil, eine große Anzahl von Klonen ohne großen Isolierungsaufwand der Plasmid-DNS testen zu können, der Nachteil gegenüber, daß u.a. auch Klone ausgewählt wurden, die keine wirkliche Regulationsbeteiligung zeigten. Der Grund dafür lag in einem eventuell leicht unterschiedlichen Wachstum einer Bakterienkolonie auf verschiedenen Nitrocellulose-Filtern, deren Autoradiographien nach der Hybridisierung untereinander verglichen wurden, und in unterschiedlichen Schwärzungshintergründen auf den Autoradiographien, bedingt durch eine unspezifische Adsorption von P-32-RNS an auf Filtern verbleibenden Bakterienzelltrümmer.
Auf den Autoradiographien wurde ein Klon, der sich in Hybridisierungsansätzen mit verschiedenen RNS-Populationen (s.Kap. 3.1.1.) durch einen relativen Schwärzungsunterschied auszeichnete, als "positiv" gewertet (siehe Abbildung 3). Auf diese Weise wurden 36 Klone ausgewählt.

3.2.3.2. Gelhybridisierung der klonierten und isolierten Ma-DNS-Stücke mit P-32-RNS

Um die klonierten 36 Ma-DNS-Stücke (s.Kap. 3.2.2.1.) weiter auf ihre Regulationsbeteiligung zu testen, wurden diese einer Gelhybridisierung (Kap. 2.7.2.) mit P-32-markierten RNS-Populationen unterzogen. Für diesen Hybridisierungstest wurde jeweils die rekombinante Plasmid-DNS über ein Miniplasmidlysat isoliert (Kap.2.6.1.), die DNS eines Isolierungsansatzes wurde für 7 Gele aufgeteilt und elektrophoretisch von E.coli RNS- und DNS-Kontaminationen getrennt (Kap. 2.3.4.4.). Die Plasmid-DNS-Mengen wurden nach Ethidiumbromidfärbung verglichen, die Gele getrocknet und unter RNS/DNS-Hybridisierungsbedingungen mit P-32-RNS (Kap. 2.7.2.) inkubiert (analog Kap. 3.2.2.1.).

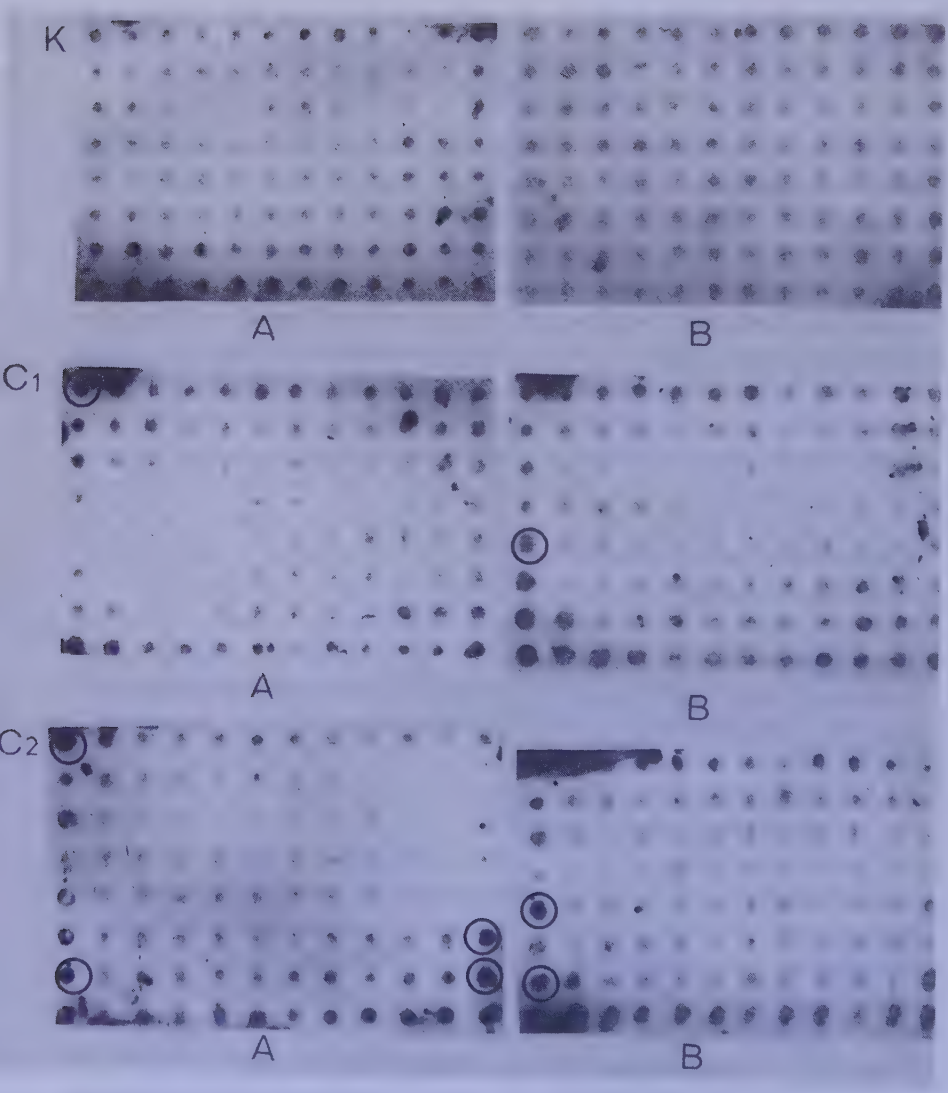


Abbildung 3: Beispiel für einen Vergleich der Autoradiographien nach Koloniefilterhybridisierung rekombinater Plasmid-DNS mit P-32-markierten RNS-Sorten, die aus Kontroll-Zellen und aus Zellen nach verschieden lang andauernder Con A-Behandlung isoliert wurden.
K...Hybridisierung mit P-32-m-RNS aus Kontroll-Zellen
C1..Hybridisierung mit P-32-m-RNS aus 45 min Con A-Zellen
C2..Hybridisierung mit P-32-m-RNS aus 60 min Con A-Zellen
A,B..zwei verschiedene Klonserien rekombinanter Plasmide

Der Vorteil dieser Gelhybridisierung gegenüber der zuerst durchgeführten Koloniefilterhybridisierung (s.Kap. 3.2.2.1.) bestand in einem niedrigeren Schwärzungshindergrund auf den Autoradiographien.
Der Nachteil dieser Methode, die zu weiterem "Mitschleppen" von nicht an der Regulation beteiligter Klone führte, beruhte auf eventuell geringen Pippetierfehlern beim Aufteilen eines Isolierungsansatzes auf mehrere Gele. Ein in das Plasmid pBR 322 eingefügtes Ma-DNS-Stück war im Gel nach Ethidiumbromidfärbung und nach der Hybridisierung auf den Autoradiographien in 2 oder 3 Banden entsprechend den Plasmidkonfigurationen "supercoil", "circulär" und "linear" zu erkennen (siehe Abbildung 4). Durch diesen Test konnten 24 von den 36 nach der Koloniefilter-Hybridisierung (Kap. 3.2.2.1.) erhaltenen Klone ausgeschlossen werden. Der Gelhybridisierungstest zeigte also noch 12 "positive" Klone.

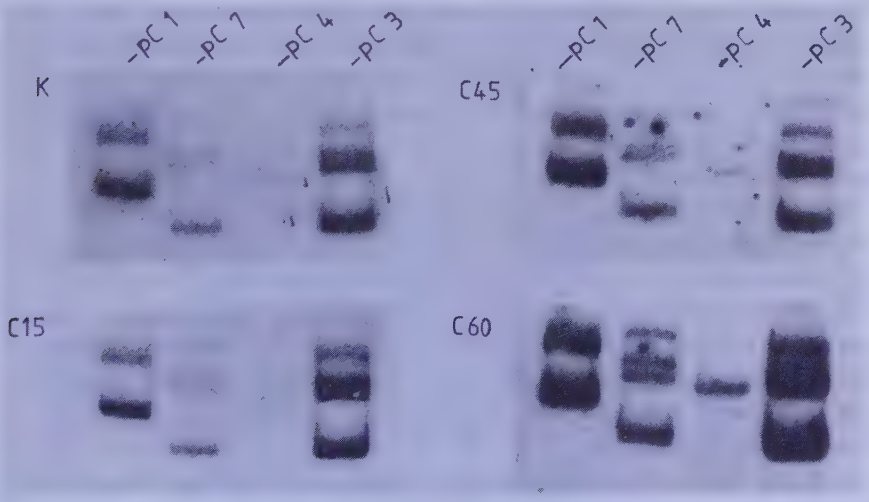


Abbildung 4: Beispiel für einen Vergleich der Autoradiographien nach Gelhybridisierung verschieden rekombinater Plasmid-DNS (pC3, pC4, pC7, pC1) mit P-32-markierten RNS-Sorten, die aus Kontroll-Zellen und aus Zellen nach verschieden lang andauernder Con A-Behandlung isoliert wurden.
K....P-32-m-RNS aus Kontroll-Zellen
C15..P-32-m-RNS aus 15 min Con A-Zellen
C45..P-32-m-RNS aus 45 min Con A-Zellen
C60..P-32-m-RNS aus 60 min Con A-Zellen

3.2.3.3. Dot-Hybridisierung fixierter RNS mit klonierten, P-32-markierten Ma-DNS-Stücken

Das Ziel, aufgrund klonierter Ma-DNS-Genstücke Unterschiede in den m-RNS-Konzentrationen nach Con A-Behandlung der Zellen exakter bestimmen zu können, lag näher durch die Möglichkeit aus einer vorselektionierten, überschaubaren Anzahl von klonierten Ma-DNS-Genstücken (Kap. 3.2.3.1. - 3.2.3.2.) jeweils größere DNS-Mengen (nach Kap. 2.6.) anzureichern.

Nach verschieden langer Con A-Behandlung der Zellen zeigen sich für bestimmte, klonierte, Gen-große Ma-DNS-Stücke relative Unterschiede in den Kern- und m-RNS-Konzentrationen.

Um diese relative Häufigkeit spezifischer RNS-Sequenzen bestimmen zu können, wurde aus Kontroll-Zellen und Zellen nach bestimmten Zeiten der Con A-Behandlung Kern- und m-RNS isoliert (s.Kap. 2.2.4. - 2.2.5.). Diese RNS-Probenserie wurde in jeweils gleicher Menge (15 µg) auf jeweils verschiedene NC- oder Biodyne A-Filter in Kreisflächen einheitlicher Durchmeser fixiert (s.Kap. 2.7.3.1.2.) und mit den nach Kap. 3.2.2.1. - 3.2.2.3. selektionierten, P-32-markierten Ma-DNS-Genstücken hybridisiert.
Die relativen Transkriptanteile in der jeweiligen RNS-Population wurden autoradiographisch nach RNS/DNS-Hybridisierung (s.Kap. 2.7.4.) bestimmt.
Die Autoradiographien in Abbildung 5 zeigen für 2 Gene einen Konzentrationsanstieg in ihrer m-RNS nach 30 bis 60 Minuten Con A-Behandlung während für 2 weitere untersuchte Gene innerhalb derselben RNS-Probenserie die entsprechenden m-RNS-Populationen annähernd konstante Konzentrationen aufweisen.
Die Ma-DNS-Stücke, deren m-RNS-Konzentrationen nach 30 min Con A-Behandlung ansteigen, zeigen in ihrer Kern-RNS-Konzentration nach 15 min Con A-Behandlung ein leichtes Absinken (siehe Abbildung 6). Nach ca. 45 min, also nach dem durch Con A-stimulierten RNS-Syntheseanstieg (Lipps und Bessler, 1977), wird die Ausgangskonzentration, d.h. die der Kontroll-Zellen, wieder erreicht.

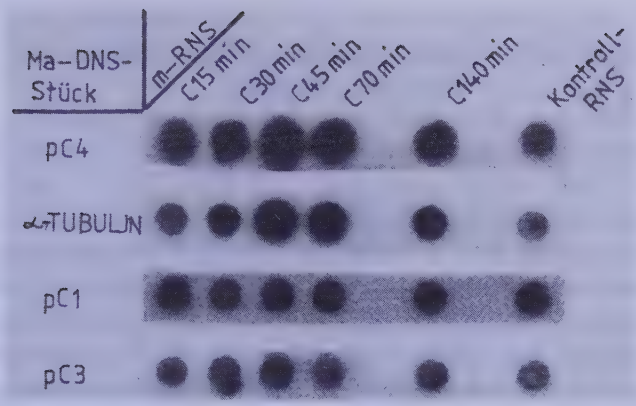


Abbildung 5: Konzentrationsveränderungen spezifischer m-RNS für zwei Gen-große Ma-DNS-Stücke (pC4 und α-Tubulin-Gen*) als Folge der Con A-Behandlung im Vergleich zu zwei Ma-DNS-Stücken (pC1, pC3), deren m-RNS-Konzentrationen über den beobachteten Zeitraum annähernd konstant bleiben. Die nach verschieden langer Con A-Behandlung der Zellen isolierte m-RNS wurde auf Biodyne A-Filtern fixiert und mit klonierten, P-32-markierten Ma-DNS-Stücken (s.Kap. 3.2.2.4) hybridisiert.

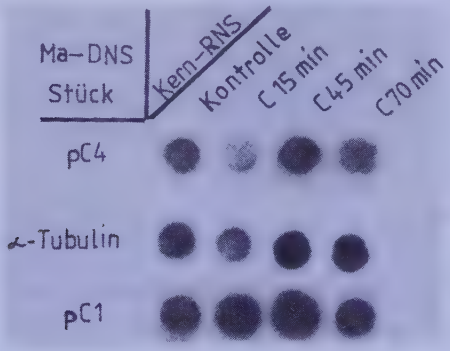


Abbildung 6: Konzentrationsabfall spezifischer Kern-RNS für zwei Ma-DNS-Stücke (pC4, α-Tubulin-Gen*) nach 15 min Con A-Behandlung. Dieselbe Kern-RNS-Probenserie wurde mit einem weiteren Ma-DNS-Stück (pC1) hybridisiert, deren Transkript-Konzentrationen auch nach Con A-Behandlung annähernd konstant bleiben.
Kern-RNS aus Kontroll-Zellen und aus Zellen nach 15, 45 und 140 min Con A-Behandlung wurde auf Biodyne A-Filtern fixiert und mit dem jeweiligen P-32-markierten Ma-DNS-Stück hybridisiert. Autoradiographien.

*) Das α-Tubulin-Gen von Stylonychia lemnae wurde freundlicherweise von Frau Dr. Helftenbein, Institut für Biologie III, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

3.3. Charakterisierung der getesteten Ma-DNS-Stücke und deren Transkriptionsprodukte

3.3.1. Größenbestimmung der klonierten Ma-DNSx-Stücke

Zur Kontrolle, ob ein Gen-großes Ma-DNS-Stück in voller Länge in den Klonierungsvektor pBR 322 inseriert war, wurde das Ma-DNS-Stück mit der Restriktionsendonuclease Pst I aus dem Plasmid geschnitten (Kap. 2.8.1.). Diese geschnittene DNS wurde parallel zu 10 µg Gesamt-Ma-DNS (siehe Abbildung 8) und einem MG-Marker gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit dem gleichen P-32-markierten Ma-DNS-Stück (Kap. 2.4.2.) hybridisiert (Kap. 2.7.2.), um das DNS-Stück in der Gesamt-Ma-DNS autoradiographisch zu lokalisieren.

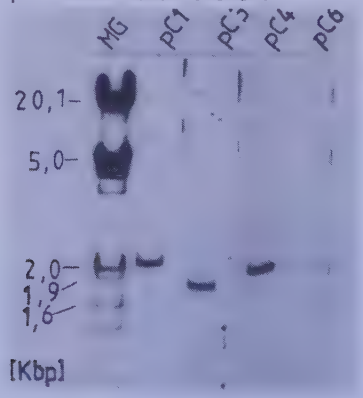


Abbildung 7: Autoradiographien zur Größenbestimmung der klonierten Ma-DNSx-Stücke. Je 10 µg Ma-DNS wurden mit dem jeweiligen P-32-markierten DNS-Stück hybridisiert.
(MG-Marker: Lambda-DNS mit Eco RI/Hind III geschnitten)

Abbildung 7 zeigt die Autoradiographien zur Größenbestimmung von 4 Ma-DNS-Stücken. Alle getesteten Ma-DNS-Stücke wurden in voller Länge ins Plasmid inseriert.

3.3.2. Größenbestimmung der m-RNS für die klonierten Ma-DNS-Stücke

Für die m-RNS-Größenbestimmung einzelner Gene wurde polysomale RNS unter denaturierenden Bedingungen im 1,5 %igen Agarose/Formaldehyd-Gel aufgetrennt (s.Kap. 2.3.4.3.). Lokalisiert wurde das entsprechende Genprodukt nach Transfer der RNS auf Filter durch Hybridisierung mit dem jeweils klonierten P-32-markierten Ma-DNS-Stück. Als Molekulargewichtsmarker diente das jeweils entsprechende Ma-DNS-Stück (s.Kap. 3.3.1.), die 25 S und 19 S r-RNS, und t-RNS.
Tabelle 1 zeigt die jeweiligen Größen in Kbp bzw kp der Gen-großen Ma-DNS-Stücke und der entsprechenden m-RNS.

Bezeichnungs des Ma-DNS-Stücks	DNS-Länge [Kbp]	m-RNS-Länge [kb]
pC1	2,1	1,8
pC3	1,8	1,5
pC4	2,1	1,6
pC6	2,1	1,5

3.4. Kopienzahlbestimmung der Gen-großen Ma-DNSx-Stücke und ihrer Transkriptionsprodukte

Die DNS im Makronucleus von Stylonchyia lemnae liegt in Gen-großen Stücken vor, die innerhalb einer Nucleotidlänge von 0,45 - 25 Kbp liegen (Lipps und Steinbrück, 1978). Gelelektrophoretisch aufgetrennte Ma-DNS zeigt nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht ein ausgeprägtes Bandenmuster (siehe Abbildung 2a unter Kap. 3.2.1.). Diese Beobachtung und die Ergebnisse von Steinbrück (1983) sprechen dafür, daß sich unter den 10.000 - 15.000 verschiedenen Ma-DNS-Stücken DNS-Sequenzen in unterschiedlicher Kopienzahl befinden. Eine veränderte Korrelation der Kopienzahl eines Ma-DNS-Stücks zu seiner m-RNS-Kopienzahl ließe auf mögliche Regulationsmechanismen auf der Ebene der Transkription oder des Processings schließen.

3.4.1. Kopienzahl der klonierten, Gen-großen Ma-DNSx-Stücke

Die 4 nach Kap. 3.2. klonierten und selektionierten Ma-DNS-Stücke kommen im Makronucleus von Stylonychia lemnae in unterschiedlicher Kopienzahl vor und zwar zwischen 4.800 und 31.800 Kopien pro Kern.
Für die Bestimmung wurden je 3 mal 10 µg Gesamt-Ma-DNS und das klonierte Ma-DNS-Stück, nachdem es aus dem Plasmid geschnitten war (Kap. 2.8.1.), in einer Verdünnungsreihe von 50 - 0,125 ng gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.3.4.4.). Nach Gelhybridisierung (Kap. 2.7.2.) mit dem jeweiligen P-32-markierten Ma-DNS-Stück wurden die P-32-DNS(x)/DNS(x)-Hybridisierungsbanden autoradiographisch lokalisiert (siehe Abbildung 8). Aus dem auf Folie getrockneten Gel wurden dann die Stellen mit gebundener Radioaktivität getrennt ausgeschnitten, und die Radioaktivitätsmenge im Scintillationscounter bestimmt.

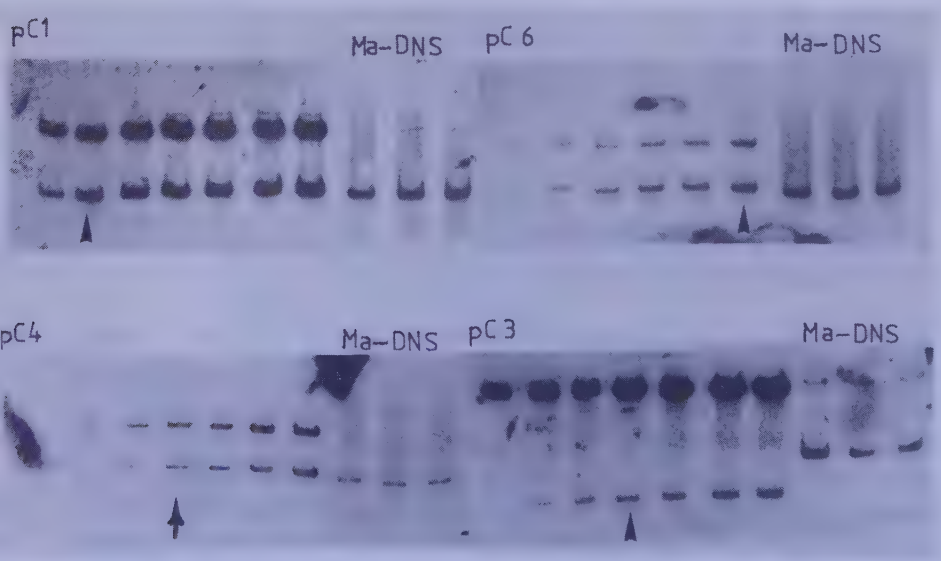


Abbildung 8: Autoradiographien zur Bestimmung der DNS-Kopienzahlen nach P-32-DNS/DNS-Hybridisierung von je 3 mal 10 µg Ma-DNS und der jeweiligen Verdünnungsreihe des klonierten Ma-DNS-Stücks (pC1, pC4, pC3, pC6) (Klone mit Pst I aus pBR 322 geschnitten).
DNS im 1,5 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

Über Mittelwertbestimmung der Radioaktivitätsmenge nach Hybridisierung mit 3 mal 10 µg Ma-DNS und Vergleich dieses Wertes mit den Radioaktivitätsmengen der Verdünnungsreihe des reinen Gens konnte die Menge des Ma-DNSx-Stücks in 10 µg Gesamt-Ma-DNS bestimmt werden.

Die Kopienzahl eines Ma-DNS-Stücks pro Makronucleus [N(DNSx)] ließ sich dann über folgende Werte bestimmen:

$$N(DNSx) = Nl \times V \times A(Kern) / L \times MG \times A$$

mit:

Nl: Loschmid'sche Zahl ($6{,}0225 \times 10^{23}$)

V [ng]: Menge des Ma-DNSx-Stücks in 10 µg Gesamt-Ma-DNS (Bestimmung siehe Abbildung 8)

MG: Molekulargewicht pro Kbp ($= 0{,}665 \times 10^{-3}$[1/kbp])

L: Länge des jeweiligen Ma-DNSx-Stücks in kbp

A(Kern): DNS-Gehalt des Makronucleus von Stylonychia lemnae ca. 788 pg (Steinbrück et al., 1981)

Nach Einsetzen der Konstanten in die obige Gleichung gilt:

$$N(DNSx) = 71.364 \times V[ng] / L[Kbp]$$

Tabelle 2: Werte zur Kopienzahl-Bestimmung von Ma-DNSx-Stücken

kloniertes DNS-Stück	DNSx-Länge [Kbp]	Ident. Mengen des jeweil. Ma-DNS-Stücks i.d. Verdünnungsreihe u. in 10 µg Ma-DNS(*)	Kopienzahl pro Makron. (n.Gl.s.o.)
pC1	2,1	2,85 ng	31.800
pC3	1,8	0,4 ng	4.800
pC4	2,1	1,35 ng	15.000
pC6	2,1	1,8 ng	20.000

(*)Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Bestimmungen

3.4.2. Bestimmung des Umrechnungsfaktors für RNS/DNS-Hybridisierungen

Für Hybridisierungen, bei denen sich beide Reaktionspartner in Lösung befanden, konnten Galau et al., 1977 zeigen, daß die Rate für eine RNS/DNS-Hybridisierung 3 - 4,5 mal niedriger lag als die Renaturierungsrate der entsprechenden DNS.
Vergleichende RNS/DNS- und DNS/DNS-Filterhybridisierungen erfordern die Bestimmung eines diesbezüglichen Umrechnungsfaktors. Diese setzt sich zum einen zusammen aus der unterschiedlichen Bindungsfähigkeit von RNS und DNS auf den Biodyne A-Filtern unter den hier verwendeten Hybridisierungs- und Waschbedingungen und zum andern aus der allgemein niedrigeren RNS/DNS-Hybridisierungsrate (s.o.).
Die Bestimmung des Umrechnungsfaktors war nötig, um Konzentrationsvergleiche spezifischer DNS- und RNS-Sequenzen aufgrund ihres klonierten und P-32-markierten Ma-DNS-Stücks durchführen zu können.
Die experimentelle Bestimmung dieses Faktors wurde anhand des ribosomalen Gens von Stylonychia lemnae durchgeführt. Das ribosomale Gen bot hier insofern Vorteile, als daß sich das Transkriptionsprodukt, die r-RNS, in größeren Mengen über Ribosomenuntereinheiten anreichern läßt (s.Kap. 2.2.4.) und das ribosomale Gen bereits kloniert vorliegt (Wenzler, 1982).
In Tabelle 3 sind die gemessenen Radioaktivitätsmengen nach Hybridisierung von P-32-r-DNS mit auf Filter fixierter r-DNS bzw. r-RNS aufgeführt.

Tabelle 3: Werte zur Berechnung des Umrechnungsfaktors für RNS/DNS-Hybridisierungen

Radioaktivitätsmenge in cpm nach Hybridisierung mit P-32-DNS(*)	gebunden an
1207 ⌀ 1266 1325	10 µg r-DNS
98 114 ⌀ 106	10 µg r-RNS

(*) angegebenen Werte aus zwei unabhängigen Hybridisierungansätzen
Der Background lag bei 8 - 15 cpm.

Aus diesen Daten läßt sich der Umrechnungsfaktor ermitteln:

$$F\ (RNS/DNS) = \frac{\text{Radioaktivitätsmenge an 1 µg r-RNS gebunden}}{\text{Radioaktivitätsmenge an 1 µg r-DNS:2 gebunden}}$$

Dabei wurde asymmetrische Transkription vorausgesetzt.

Für vergleichende RNS/DNS- und DNS/DNS-Filterhybridisierungen muß unter den hier verwendeten Bedingungen (s.Kap. 2.7.4.) ein Umrechnungsfaktor von 6 berücksichtigt werden.

3.4.3. Bestimmung der RNS-Menge einer Zelle

Voraussetzung für die Bestimmung der Anzahl spezifischer m-RNS-Moleküle pro Zelle ist die Kenntnis des Gesamt-RNS-Gehalts einer Zelle.
Die zu ihrer Bestimmung verwendete Methode beruht auf der Messung des DNS-Anteils isolierter Gesamt-Nucleinsäuren von Stylonychia lemnae (s.Kap. 2.2.2.).
Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung (Kap. 2.3.1.) wurden die Gesamt-Nucleinsäuren mit und ohne RNase-Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.3.4.4.) (s.Abbildung 10).
Der DNS-Anteil der Gesamt-Nucleinsäuren wurde durch Vergleich der Radioaktivitätsmengen nach Renaturierung (Kap. 2.7.2.) von im Gel aufgetrennter Gesamt-Nucleinsäure und Ma-DNS definierter Menge mit P-32-markierter r-DNS bestimmt (s.Tabelle 4).

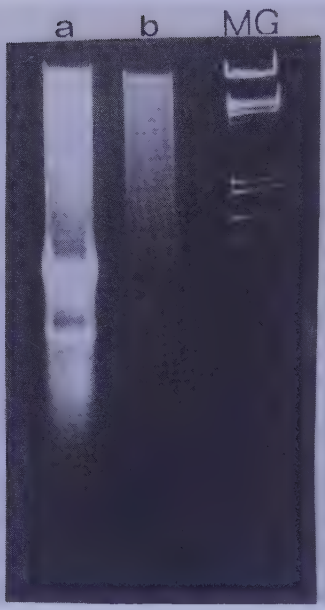


Abbildung 9: Gesamt-Nucleinsäuren (a) und Ma-DNS (b) von Stylonychia lemnae in 2 %igem Agarose-Gel aufgetrennt, Ethidiumbromidfärbung.
MG-Marker: Lambda-DNS, Eco R I/Hind III verdaut.

Tabelle 4: Werte zur Bestimmung der RNS-Menge einer Zelle

Gelelektrophoretisch aufgetrennt	Radioaktivitätsmenge in cpm(*) nach P-32-rDNS/DNS-Hybridis.
3 x 0,12 OD(260nm) Ma-DNS	435 420 Ø 428,7 431
3 x 0,24 OD(260nm) Gesamt-Nucleinsäure	502 491 Ø 497,7 500

(*) Werte, denen 3 verschiedene Gesamt-Nucleinsäure-Isolierungen zugrunde liegen.

Von den 0,24 OD(260 nm) im Gel aufgetrennten Gesamt-Nucleinsäuren sind 0,10 OD(260 nm) entsprechend 5 µg Ma-DNS. Die RNS-Menge in 0,24 OD(260 nm) Gesamt-Nucleinsäuren läßt sich somit auf 0.14 OD(260 nm) entsprechend 5,6 µg berechnen.
Unter Berücksichtigung der mikrospektrophotometrisch bestimmten DNS-Menge von ca. 788 pg pro Makronucleus der Stylonychia-Zelle (Steinbrück et al., 1981) ließ sich dann der RNS-Gehalt einer Zelle mit ca. 880 pg angeben.
Unter der Voraussetzung, daß durchschnittlich 2/3 der Information eines Ma-DNS-Stücks in Form von RNS im Cytoplasma zu finden ist (Nock, 1981), kann die durchschnittliche RNS-Kopienzahl ermittelt werden. In einer Zelle findet man somit im Durchschnitt ca. 1,7 mal mehr RNS- als DNS-Moleküle. Diese Angabe variiert vermutlich sehr stark in Abhängigkeit vom jeweils betrachteten Gen und trifft vor allem für die Verhältnisse beim ribosomalen Gen zu, dessen RNS über 90 % der Gesamt-RNS ausmacht.

Die Bestimmung des RNS-Gehalts wurde für Zellen durchgeführt, die am Tag zuvor nur leicht gefüttert worden waren, sodaß zum Zeitpunkt der Nucleinsäurenisolierung eine Chlorogonium-Kontamination ausgeschlossen werden konnte. Die Zellen befanden sich somit in stationärer Wachstumsphase. Bei gut wachsenden Zellen wäre die Messung der RNS-Menge schwieriger, da dann die Gefahr besteht, daß RNS aus Chlorogonium-Zellen mitisoliert wird.

3.4.4. Bestimmung des DNSx/RNSx-Kopienzahlverhältnisses

Hier sollte geklärt werden, ob ein DNS/RNS-Kopienzahlverhältnis eines Gens von durchschnittlich 1 : 1,7 in einer nicht wachsenden Zelle (Kap. 3.4.2.) speziell auch bei den 4 klonierten und isolierten Ma-DNS-Stücken zu finden ist oder ob eine von der jeweiligen DNS-Kopienzahl (s.Kap. 3.4.1.) abhängige Korrelation zur entsprechenden m-RNS-Zahl vorliegt.

Für das DNSx/RNSx-Kopienzahlverhältnis eines bestimmten Ma-DNS-Stücks gilt folgende Gleichung:

$$\frac{RNSx}{DNSx} = \frac{L(DNSx) \times R(RNSx) \times 1{,}1}{L(RNSx) \times R(DNSx) \times F(RNS/DNS)}$$

mit:

- Faktor 1,1: RNS/DNS-Mengen-Verhältnis in einer Zelle
- gebundene Radioaktivitätsmenge [R] nach Hybridisierung des P-32-markierten Ma-DNS-Stücks mit einer definierten Menge Ma-DNS [R(DNSx)] und cytoplasmatischer RNS [R(RNSx)]
- Länge des Ma-DNS-Genstücks [L(DNSx)] und dessen m-RNS [L(RNSx)]
- Umrechnungsfaktor für RNS/DNS-Hybridisierung [F(RNS/DNS)] (s.Kap. 3.4.2.)

Tabelle 4: Werte zur Bestimmung des RNSx/DNSx-Kopienzahlverhältnisses für bestimmte Ma-DNS-Stücke

Ma-DNS-Stücke	DNS-Länge [Kbp]	m-RNS-Länge [kb]	Radioaktivitätsmenge[cpm] (*1) nach Hybridis. mit		RNSx/DNSx-Kopienzahl-verhältn.
			10 µg DNS	20 µg RNS	
pC1	2,1	1,6	10.712	349	0,14 : 1
pC3	1,8	1,5	2.091	1.628	3,1 : 1
pC4	2,1	1,6	5.893	190	0,36 : 1
pC6	2,1	1,5	2.788	154	0,25 : 1
α-Tub.	1,85*2	1,6	18.465	18.465	0,85 : 1
Gen	1,73				

*1 Mittelwerte aus 4 Bestimmungen

*2 Werte nach Helftenbein, 1984

Die m-RNS-Kopienzahl eines Gens ist folglich nicht proportional zu seiner Ma-DNS-Kopienzahl. Für die hier untersuchten 5 Gene liegt ein DNS/RNS-Kopienzahlverhältnis von 1 : 0,14 bis 1 : 3,1 vor. D.h. die Variationsbreite der auf die zugrundeliegenden DNS- normierte m-RNS-Kopienzahlen liegt bei einem Faktor 22

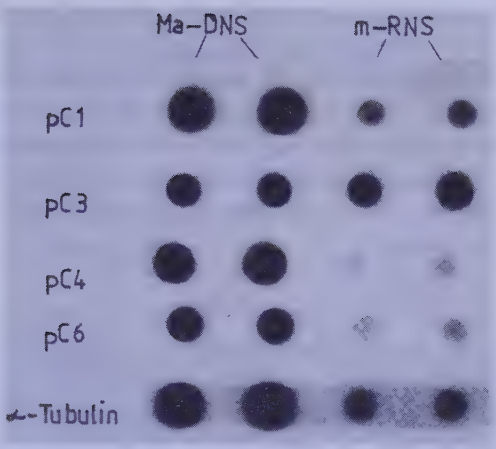


Abbildung 10: Autoradiographien nach Hybridisierung des jeweiligen, P-32-markierten Ma-DNSx-Stücks (pC1 - pC6) mit je 2 mal 10 µg Ma-DNS und 2 mal 20 µg RNS

3.5. Genregulation aufgrund selektiver DNS-Amplifikation?

Die selektive Genamplifikation als eine Möglichkeit einer Genexpressionsverstärkung wurde in den letzten sieben Jahren in einer wachsenden Zahl von Fällen aufgezeigt, nachdem z.B. Schimke et al., 1978 die Amplifikation des Dihydrofolat-Reductase-Gens entdeckt hatte.
Einen Verdacht, daß eventuell eine selektive DNS-Amplifikation nach Con A-Behandlung von Stylonychia lemnae an der Genregulation beteiligt sein könnte, ließen die Beobachtungen von Lipps und Bessler, 1976 und 1977 zu. Eine Stunde nach Con A-Behandlung beobachteten sie Teilungen von Mikro- und Makronuclei in einigen Zellen und nach 5 - 6 Stunden in allen Zellen, wobei die Kerne oft asymmetrisch verformt waren.

Zur Klärung, ob dieses Regulationsprinzip im vorliegenen System zu finden ist, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Von einem Paarungstyp des Ciliaten wurde Ma-DNS (Kap. 2.2.1.) nach 30 min, 1, 3 und 6 Stunden Con A-Behandlung und aus Kontroll-Zellen isoliert und in gleichen Mengen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Hybridisierungsproben dienten die klonierten, P-32-markierten Ma-DNS-Stücke, deren m-RNS einen zeitabhängigen Konzentrationsanstieg nach Con A-Behandlung zeigen (s.Kap. 3.2.). Als interner Standard diente ein markiertes Ma-DNS-Stück, dessen Transkriptionsprodukt mit und ohne Con A-Behandlung in gleichen Mengen in der Zelle vorkommt.

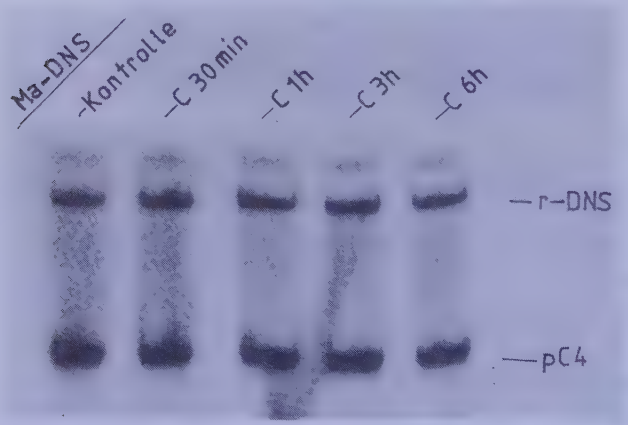


Abbildung 11: Beispiel einer Autoradiographie nach Hybridisierung von an der Regulation beteiligter, klonierter und P-32-markierter Ma-DNS-Stücke mit Ma-DNS, die aus Kontroll-Zellen und Zellen nach 30 min, 1, 3 und 6 Stunden Con A-Behandlung isoliert wurde. Je 10 µg Ma-DNS wurden im 1,5 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

Die Auswertung der Autoradiographien (z.B.Abbildung 11) läßt keine selektiv amplifizierte Ma-DNS für die getesteten Ma-DNS-Stücke (r-DNS, α-Tubulin-DNS, pC4 und pC6) erkennen.

3.6. Versuche zur Translation der RNS aus Stylonychia

Um eine vermutlich direkte Korrelation zwischen spezifischer m-RNS-Erhöhung (s.Kap. 3.2.3.) und der entsprechenden Proteinneusynthese (s.Kap. 3.7.) nachweisen zu können, wäre ein direkter Test die Translation von isolierter Stylonychia-RNS in einem heterologen System gewesen.

3.6.1. In-vitro-Translation

Die Schwierigkeiten, Stylonychia-RNS im Reticulocytensystem zu translatieren, konnten jedoch nicht überwunden werden.
Die RNS wurde u.a. nach den unter Kap. 2.2.2. - 2.2.4. beschriebenen Methoden isoliert, wobei die Phenolextraktion im einen Fall mit und im andern ohne SDS-Zugabe erfolgte. Zur weiteren Reinigung wurde die RNS bis zu 4 mal mit Äthanol umgefällt und dazwischen mit Natriumacetat gewaschen. Weiterhin wurde die RNS im Translationsystem getestet, nachdem sie von weiteren Verunreinigungen nach KCl- und Äthanolpräzipitation (Schröder und Schröder, 1982) abgetrennt worden war.
Da das Translationsystem mit TMV-Virus RNS als Template eine gute Translationsaktivität zeigte, jedoch nach zusätzlichem Einsetzen von Stylonychia-RNS die TMV-Virus-RNS nur noch in stark verminderten Umfang translatiert wurde, lag der Verdacht nahe, daß Inhibitoren mit der Stylonychia-RNS in das System eingeschleppt worden waren. Sollte es sich dabei um niedermolekulare RNS-Sequenzen als Translationsinhibitoren handeln, die mehrfach beschrieben wurden (Bathurst und Smith, 1982; Kühn et al., 1982; Dudley und Northcot, 1978), so müßte eine Auftrennung der RNS im Sucrosegradienten mit anschließender Fraktionierung des Gradienten zu einer Translationsfähigkeit der RNS einiger hochmolekularer Fraktionen führen. Die Stylonychia-RNS einiger hochmolekularer Fraktionen konnte danach translatiert werden. Die hohen Verluste bei dieser Reinigungsprozedur würden jedoch eine routinemäßige Durchführung erheblich erschweren.

Generell scheint es mit Schwierigkeiten verbunden zu sein, Ciliaten-RNS im In-vitro-System zur Translation zu bringen (Hallberg, Gorovsky, pers. Mitteilungen). Dies mag sicherlich auch damit verbunden sein, daß innerhalb codierender Regionen von Ciliaten-Genen wie dem -Tubulin-Gen von Stylonychia (Helftenbein, 1984), den Immobilisationsantigenen von Paramecium (Fourny et al., 1983) und dem G-Oberflächen-Antigen von Tetrahymena (Meyer, in Gall, 1984) Codons liegen, die von anderen Eucaryonten, folglich auch vom Reticulocyten-System des Kaninchens, als Translationsstop erkannt werden.

3.6.2. In-vivo-Translation

Wie unter Kap. 2.10.2. beschrieben, wurde Stylonychia-RNS in Xenopus laevis-Oocyten zur Translation injiziert. Die nach Injektion von Stylonychia-RNS synthetisierten, S-35-markierten Proteine ließen nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgrund der starken internen Proteinsynthese der Xenopus-Oocyten keine Proteinbanden unterscheiden.

3.7. Proteinsynthese der Zellen nach Con A-Behandlung

3.7.1. Proteinanalyse nach ein-dimensionaler Elektrophorese

Ein zeitlich differentieller Verlauf der Proteinsynthese nach Con A-Behandlung der Zellen läßt sich durch Pulsmarkierung mit der radioaktiven Aminosäure S-35-Methionin (Kap. 2.9.) zeigen. Verglichen wurden Kontroll-Zellen und Zellen nach unterschiedlich langer Con A-Behandlung in Intervallen von 15 Minuten. Weiter wurden die neu synthetisierten Proteine von Zellen während eines leichten (Temperaturerhöhung auf 35°C) und eines stärkeren (39°C), jeweils 5 min dauernden Hitzeschocks markiert und parallel analysiert.

Die Autoradiographie (Abbildung 12a) nach ein-dimensional gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 2.9.3.) läßt markante Unterschiede im Proteinbandenmuster in den in Abbildung 12 b tabellarisch angegebenen Molekulargewichtsbereichen sowie über den angegebenen Zeitraum erkennen.
Als Molekulargewichtsmarker dienten Kalbsthymus-Histone und ein Proteingemisch mit Phosphorylase A (92,5 KD), BSA (66.2 KD), Ovalbumin (45 KD), Carbonylanhydrase (31 KD), Soybean Trypsin Inhibitor (21,5 KD) und Lysozym (14,4 KD).

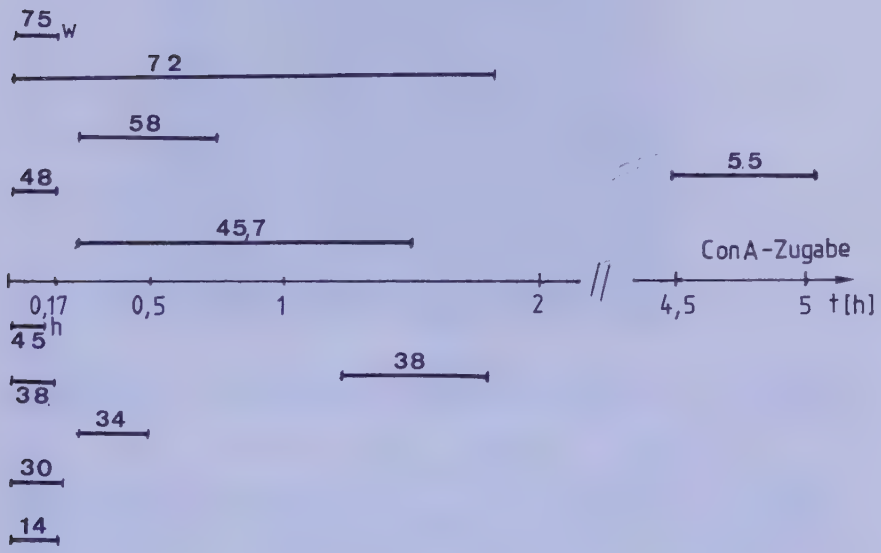


Abbildung 12b: Tabellarische Darstellung der verstärkten Proteinbanden (Abbildung 12a) bezüglich der Kontroll-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Con A-Zugabe. (Die Zahlenwerte über den Balken geben das MG in kD an).

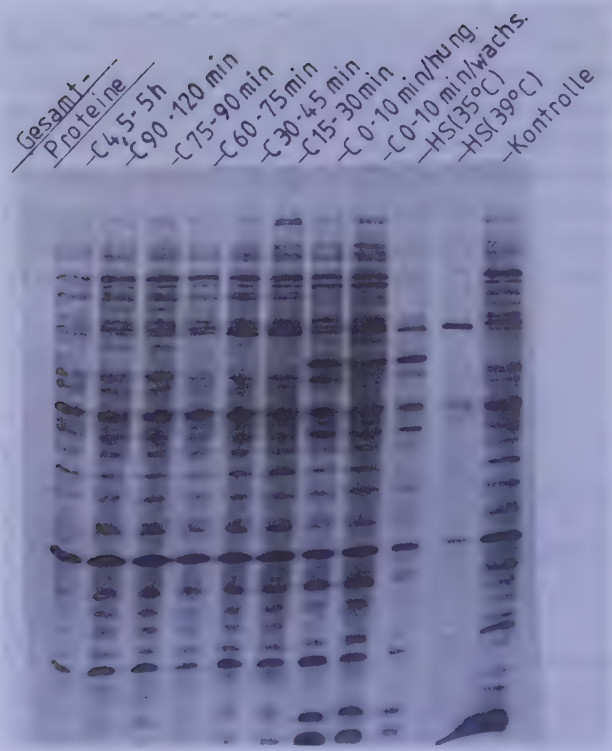


Abbildung 12a: Das jeweils veränderte Proteinbandenmuster von Stylonychia lemnae in Intervallen nach Con A-Behandlungsbeginn (C) und 5 min Hitzeschock (H).
Mit S-35-Methionin markierte Gesamt-Proteine wurden im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, Fluorographie.
MG-Bestimmung: Protein-MG-Marker (s. Text) wurden auf den beiden äußeren Gelbahnen mitaufgetrennt, mit Coomassie blue gefärbt und in der Höhe des jeweiligen Marker-Proteins wurde vor der Fluorographie eine Spitze aus dem Gel geschnitten.

Die hier gezeigten verstärkten Proteinsynthesen heben sich jedoch nach Silber-Färbung nicht in Färbungsunterschieden von der vorhandenen Gesamt-Proteinmenge ab.

Um Anhaltspunkte über die mögliche Funktion der verstärkt synthetisierten Proteine zu bekommen, wurde versucht ihre Lokalisation in der Zelle zu bestimmen.
Eine zu den in-vivo-markierten Gesamt-Proteinen parallele Auftrennung von Kernproteinen (s.Kap. 2.9.2.2.) zeigt bei Con A-Zellen innerhalb der ersten 10 Minuten verglichen mit Kontroll-Zellen, verstärkte Banden im Bereich der Histone H2A (siehe Abbildung 13). In diesem Falle tritt der Proteinsyntheseunterschied zwischen Con A- und Kontroll-Zellen stärker auf, wenn die Zellen gleichzeitig hungern.

Eine parallele Auftrennung von polysomalen Proteinen (angereichert nach Kap. 2.2.4.) läßt den Schluß zu, daß sie nach Con A-Behandlung der Zellen nicht selektiv verstärkt synthetisiert werden.

Im Verlauf der Pellicula- und Cilienregeneration könnten Proteine, wie z.B. Tubuline und Dynein, die am Aufbau von Mikrotubuli-Strukturen beteiligt sind, koordiniert neu synthetisiert werden.
Das Gesamtprotein-Muster von Stylonychia zeigt im SDS-Polyacrylamidgel im MG-Bereich des dazu parallel aufgetrennten angereicherten Dyneins von Tetrahymena (MG 300 KD)(*2) nur schwach färbbare und autoradiographisch nicht bestimmbare Proteinbanden (siehe Abbildung 14).

(*2) Die angereicherten Dynein- und Tubulin-Proteine von Tetrahymena wurden freundlicherweise von Dr. H.-M. Seyfert, Justus-Liebig-Universität Giessen, zur Verfügung gestellt.

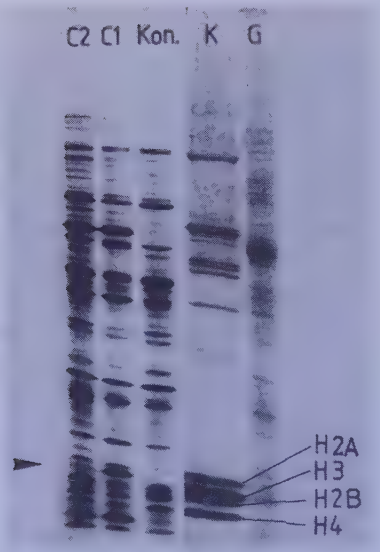


Abbildung 13: Veränderungen im Proteinmuster von Stylonychia, die als Folge der Con A-Behandlung auftreten. Autoradiographie nach Auftrennung der S-35-pulsmarkierten Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel (7,5 - 15 %). Proteinsynthese während 10 min Con A-Behandlung von hungernden (C1) und wachsenden (C2) Zellen. Parallel aufgetrennte, Coomassie blue-gefärbte Gesamt- und Kern-Proteine.

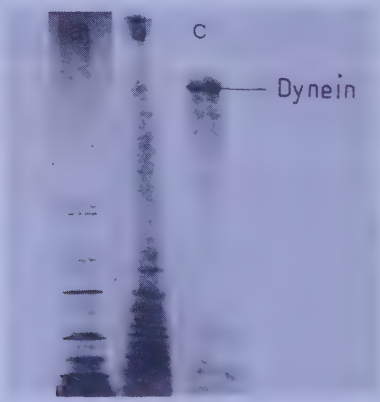


Abbildung 14: Autoradiographie (a) und Coomassie blue- Färbung (b) des Gesamtproteinmusters von Stylonychia lemnae. Parallel dazu aufgetrennt Coomassie blue- gefärbtes, angereichertes Dynein (c) von Tetrahymena (*2). SDS-Polyacrylamid-Gel (3 - 10% Gradient).

3.7.2. Proteinanalyse nach zwei-dimensionaler Elektrophorese

Eine sehr viel bessere Auflösung und eine zum Molekulargewicht zusätzliche Charakterisierung der neu synthetisierten Proteine durch ihren Isoelektrischen Punkt ermöglicht die zwei-dimensionale Elektrophorese (O'Farrell, 1975, O'Farrell et al., 1977, s.Kap.2.9.4.).

Sowohl Con A-Behandlung als auch leichter Hitzeschock (35°C) führen innerhalb von 10 Minuten zu einem markanten Syntheseanstieg von Proteinen (S1, S2) mit einem MG von 46 und 38 KD (s.Abbildung 16). Der IEP liegt für das S1-Protein bei einem pH von ca. 10, für die S2-Proteine zwischen pH=5 und 6.

Das Phänomen stress-induzierter Proteinsynthese zeigen auch Tetrahymena nach Hitzeschock, Deciliation und Sauerstoffmangel innerhalb von 10 - 20 Minuten (Guttmann et al., 1980) und Drosophila nach Hitzeschock innerhalb von 10 Minuten (Mirault et al., 1978).
Der quantitative Vergleich durch Messung der Radioaktivitätsmenge der aus dem Gel geschnittenen Proteinregionen von normalen und stimulierten Zellen zeigt jeweils einen 3,5 fachen Proteinsyntheseanstieg.

3.7.3. Identifizierung der Tubulin-Proteine

Das Pflanzenlectin Concanavalin A bindet an Strukturen der Pellicula und verklebt die Cilien, worauf die Zellen ihre Pellicula abwerfen (Frisch et al., 1976).
Da im Verlauf der Pellicula- und Cilienregeneration auch neue Mikrotubuli-Strukturen aufgebaut werden müssen, scheint die Annahme gerechtfertigt, daß eine verstärkte Tubulinsynthese daran beteiligt sein könnte.

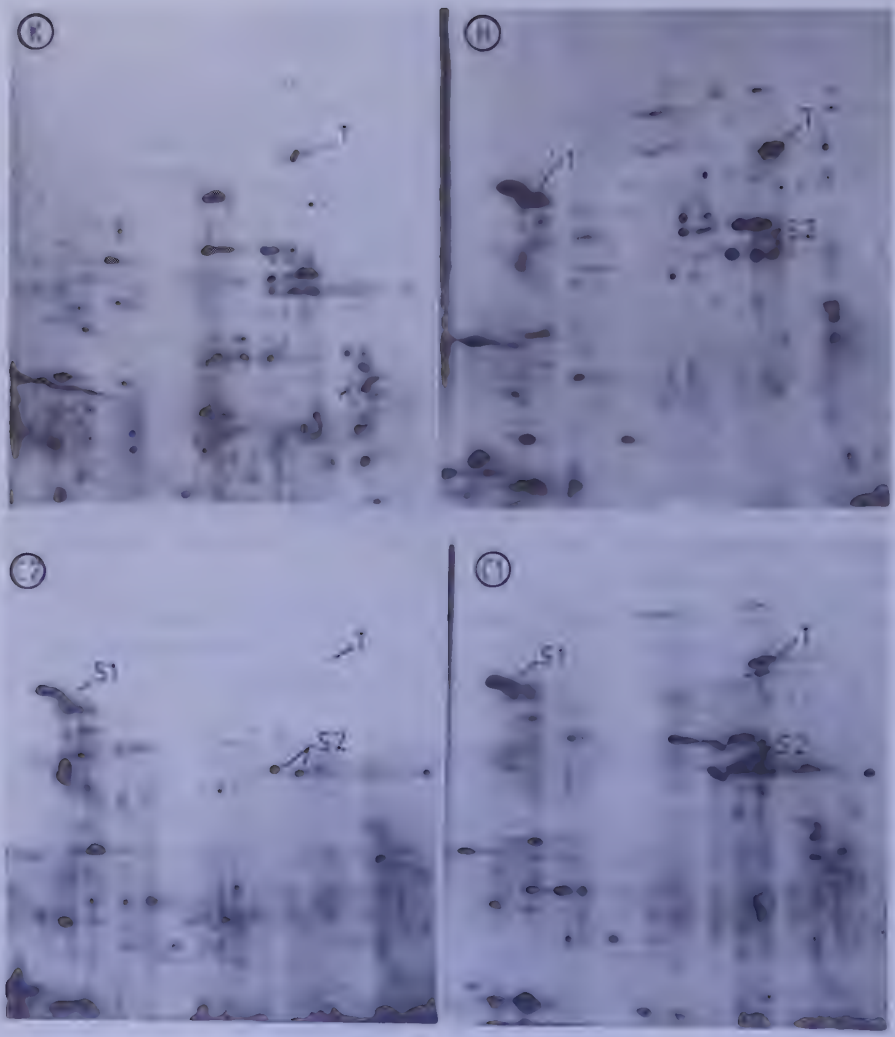


Abbildung 15: Veränderungen im Proteinsynthesemuster von *Stylonychia Teminae* bezüglich der Kontroll-Zellen (K), die nach 10 min Con A-Behandlung von hungernden (C1) und wachsenden (C2) Zellen auftreten. (H) zeigt Proteine von Zellen während eines leichten (35°C) 5 min dauernden Hitzeschocks.
H = Hitzeschock-Proteine, S1, S2 = Streßproteine, T = Tubulin-Proteine
Autoradiographien nach zwei-dimensionaler Elektrophorese
erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (pH=11-4)(s.Kap.2.9.4.)
zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gel (12,5 %)
MG-Bestimmung: analog zu Abbildung 12a.

Im ein-dimensional aufgetrennten Gesamt-Proteinmuster wurden die Tubulin-Proteine durch eine immunenzymatische Methode (s.Kap. 2.9.7.) lokalisiert. Dieser Nachweis der Tubulin-Proteine beruht auf einer Tubulin-Antigen-Antikörper-Erkennung(*1) und einer an einen zweiten Antikörper gekoppelten Peroxidase-Farbreaktion.
Abbildung 16 zeigt das Gesamt-Proteinmuster von Stylonychia lemnae nach Silber-Färbung und die Lokalisierung der Tubulin-Proteine nach Transfer der Gesamt-Proteine auf Nitrocellulose-Filter und immunenzymatischer Reaktion. Parallel aufgetrennte Gesamt-Proteine und angereicherte Tubulin-Proteine(*2) von Tetrahymena zeigen Übereinstimmung im Molekulargewicht der Tubulin-Proteine beider Ciliaten-Zellen.

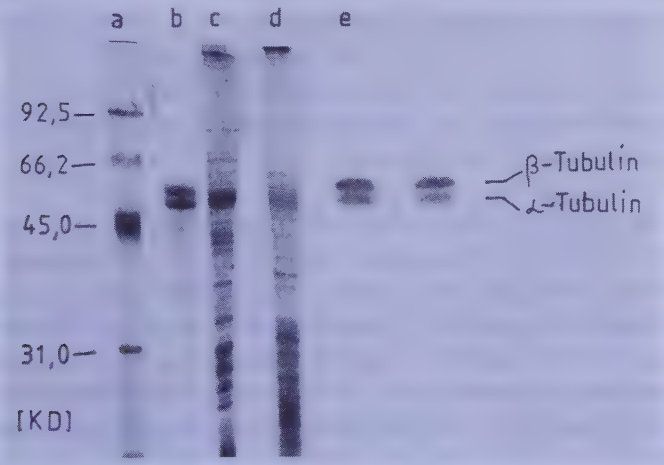


Abbildung 16: Lokalisierung der Tubulin-Proteine im Gesamt-Proteinmuster von Stylonychia lemnae und Tetrahymena.
a) MG-Marker-Proteine
b) angereichterte Tubulin-Proteine von Tetrahymena (*2)
c) Gesamt-Proteine von Stylonychia lemnae
d) Gesamt-Proteine von Tetrahymena
e) Auf Nitrocellulose-Filter transferierte Gesamt-Proteine nach Tubulin-Antigen-Antikörper-Erkennung (*1) und daran gekoppelter Peroxidase-Farbreaktion.
Proteinauftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel (12,5 %)
[a - d] Silberfärbung (s.Kap. 2.9.5.2.)

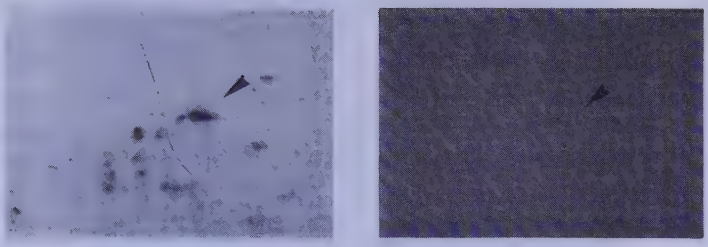
(*1) Das Tubulin-Antikörper-Serum wurde freundlicherweise von Dr. A. Adoutte, Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette, Frankreich, zur Verfügung gestellt.

Eine exakte Lokalisierung der Tubulin-Proteine im zwei-dimensionalen Gel war dadurch erschwert, daß offensichtlich der Tubulinanteil der Gesamt-Proteine von Stylonychia relativ niedrig ist.
Um für die immunenzymatische Reaktion eine größere Proteinmenge nach der Methode von O'Farrell, 1975, zwei-dimensional auftrennen zu können, wurden die S-35-markierten Gesamt-Proteine in Röhrchengelen mit einem Durchmesser von 6 mm und einer größeren Maschenweite des Polyacrylamids (s.Kap. 2.9.4.) isoelektrisch fokussiert. Zwar waren hier die Proteine mit den charakteristischen Daten (MG, IEP) der Tubuline im zwei-dimensionalen Gel mit Silber anfärbbar (s.Kap. 2.9.5.2.), jedoch - und dieser Schritt war für die Durchführung der Immunreaktion nötig - waren diese Proteine nach dem Transfer auf NC-Filter nicht in mit Coomassie-blue oder Amidoschwarz anfärbbaren Mengen vorhanden.

Eine relativ schwache Peroxidase-Farbreaktion war nach Tubulin-Antigen-Antikörper-Bindung im zwei-dimensionalen Gesamt-Proteinmuster von Stylonychia zu erkennen (siehe Abbildung 17).

Da es sich bei den Tubulin-Proteinen um relativ konservative Proteine handelt, und die Molekulargewichte zwischen Tetrahymena- und Stylonychia-Tubulinen identisch sind (siehe Abbildung 16), wurden als weitere Identifizierungshilfe angereicherte Tetrahymena-Tubuline(*2) eingesetzt. In parallel durchgeführten zwei-dimensionalen Proteinauftrennungen wurden zu S-35-markierten Gesamt-Proteinen von Stylonychia angereicherte, nicht markierte Tetrahymena-Tubuline gegeben. Nach Proteinfärbung mit Silber und anschließender Autoradiographie konnten die Tubuline von Stylonychia identifiziert werden (siehe Abbildung 17).

In Abbildung 18 werden Veränderungen der Tubulin-Proteinsynthese nach verschieden lang andauernder Con A-Behandlung der Zellen deutlich. Eine verstärkte Tubulinsynthese ist zwischen 0 - 10 min und 15 - 60 min nach Con A-Behandlungsbeginn zu beobachten.



a b

Abbildung 17: Identifizierung der Tubulin-Proteine von Stylonychia lemnae im zwei-dimensionalen Gesamt-Proteinmuster durch Tubulin-Antigen-Antikörper-Erkennung (*1) und einer daran gekoppelten Peroxidase-Farbreaktion b). Autoradiographie a).
erste Dimension: IEP (pH = 7,2 bis 4)
zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gel (10 %)

Auch unter leichtem (35°C) und starkem (39°C) Hitzeschock synthetisiert Stylonychia verstärkt Tubulin-Proteine (siehe Abbildung 18). Diese verstärkt synthetisierten Tubulin-Proteine sind jedoch nicht identisch mit den Hitzeschock-Proteinen, die Dollak, 1982, beschrieben hat. Er führte den hier als schwach bezeichneten Hitzeschock (35°C) durch, und beobachtete die Synthesesteigerung mehrerer Proteine. Die hier als Streßproteine S2 auch als Folge der Con A-Behandlung verstärkt synthetisierten Proteine sind identisch mit seinen Hitzeschock-Proteinen (siehe Abbildung 15). Beim starken Hitzeschock (39°C) wird die Synthese der meisten Proteine stark reduziert, mit Ausnahme der α-Tubulin-Synthese (siehe Abbildung 12a und 18).

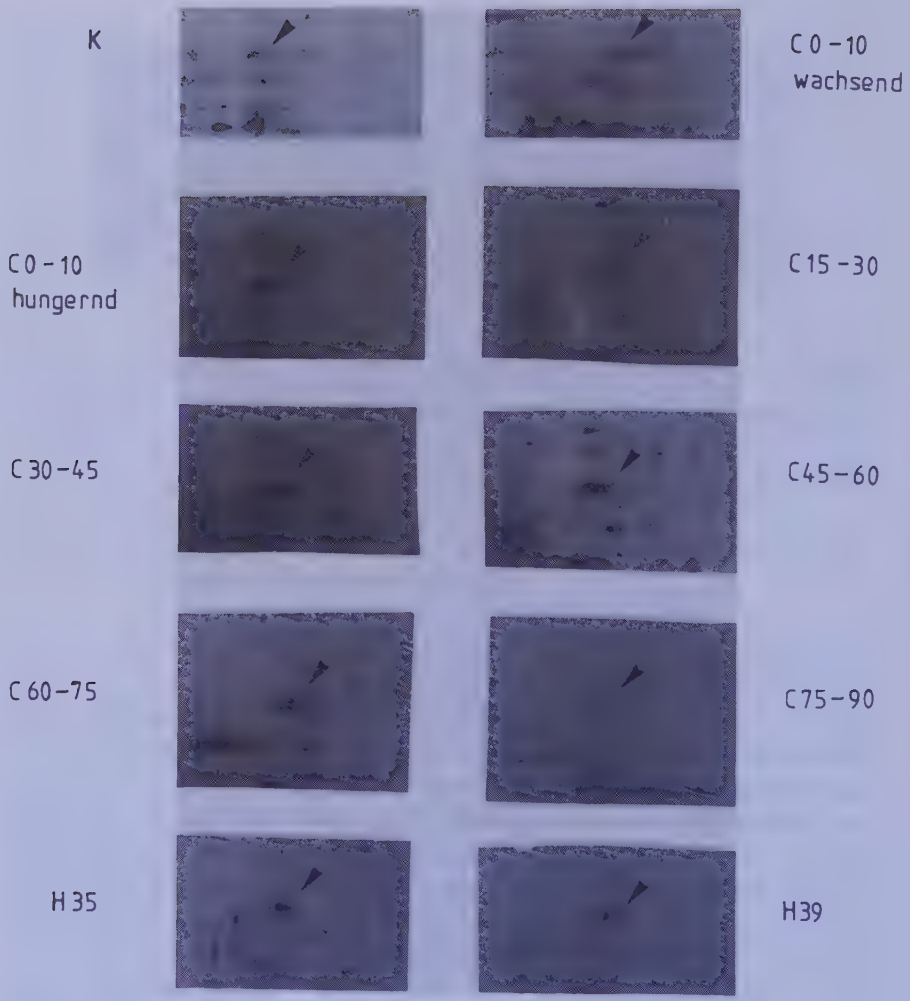


Abbildung 18: Veränderungen der Tubulin-Proteinsynthese von Stylonychia lemnae, die als Folge der Con A-Behandlung und der Hitzeschock-Einwirkung auftritt.
Für Con A-behandelte Zellen (C) sind die Markierungsintervalle mit S-35-Methionin in min angegeben. Die 5 min dauernde Hitzeschock-Einwirkung war bei 35°C (HS 35) und 39°C (HS 39).
Autoradiographien nach zwei-dimensionaler Elektrophorese
erste Dimension: IEF: pH = 7 - 4,5
zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gel (12,5 %).

4. DISKUSSION

Die erwähnten Besonderheiten der hypotrichen Ciliaten, wie Kerndualismus mit unterschiedlicher Genaktivität von Mikro- und Makronucleus und vor allem die Genomorganisation des Makronucleus in Gen-großen DNS-Stücken, lassen diese Einzeller als lohnendes Untersuchungsobjekt für Fragen der Genomorgnisation und Genregulation erscheinen. Da auf den Ma-DNS-Stücken außer den codierenden Regionen vermutlich alle Sequenzen liegen, die für deren Transkriptionsregulation und Replikation nötig sind (Lawn et al., 1978; Lipps et al., 1978; Wünning und Lipps, 1983; Helftenbein, 1984), wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, solche Ma-DNS-Stücke zu isolieren, die in ein koordiniertes Regulationsgeschehen verwickelt sind.

Hierzu stellt die Ciliatenzelle nach Kontakt mit dem Pflanzenlectin Concanavalin A ein gut synchron stimulierbares System dar. Das Concanavalin A lagert sich an definierte Oberflächenstrukturen der Ciliatenzelle, worauf die Zelle ihre Pellicula abwirft (Frisch et al., 1976). Im Verlauf der Pellicularegeneration ist nach 30 min bis zu einem Maximum nach 60 min ein RNS-Synthese-Anstieg zu beobachten (Lipps und Bessler, 1976). Die Ergebnisse von Knowles et al., 1976, legen nahe, daß es sich dabei um eine spezifische Genaktivierung handelt. Injizierten sie diese RNS in nach Con A-Behandlung "hüllenlose" Stylonychia-Zellen, deren eigene RNS-Synthese durch Actinomycin D blockiert worden war, dann überlebten diese Zellen länger als entsprechende, denen RNS aus unbehandelten Zellen injiziert wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde u.a. die RNS als erstes Produkt der Genexpression zwischen Kontroll- und Con A-Zellen vergleichend untersucht. Die zunächst durchgeführte gelelektrophoretische Analyse der cytoplasmatischen RNS aus Kontroll-Zellen und aus Zellen, die nach 30 und 60 min mit Con A behandelt worden waren, zeigen nur relativ schwache RNS-Bandenunterschiede nach Ethidiumbromidfärbung (siehe Abbildung 1). Dies schließt jedoch eine differentielle Genexpression auf RNS-Ebene nicht aus, da Unterschiede von m-RNS im Größenbereich der r-RNS mit dieser Methode

nicht erkannt werden können. Die r-RNS mit ihrem 94 % Anteil an der Gesamt-RNS von Stylonychia (Nock, 1979) würde vorhandene m-RNS-Intensitätsunterschiede abdecken.

Tatsächlich vorhandene quantitative m-RNS-Unterschiede zwischen Kontroll- und Con A-Zellen zeigen jedoch die Filterhybridisierungen. Deren Autoradiographien (siehe Abbildung 2) zeigen unterschiedliche Bandenmuster nach Hybridisierung von P-32-markierter m-RNS aus Kontroll- und Con A-Zellen mit auf elektrophoretisch aufgetrennter und auf Filter übertragener Ma-DNS. Mit dieser Methode wurde das Molekulargewicht der Ma-DNS-Stücke bestimmt, deren Transkriptionsprodukte Konzentrationsunterschiede zwischen Kontroll- und stimulierten Zellen aufweisen. Es zeigen sich hiernach im Hybridisierungsmuster Bandenunterschiede bei 2,1 und 1,8 kbp. Erfaßt werden jedoch mit dieser Methode nur Unterschiede zwischen Kontroll- und Con A-m-RNS, bei denen entsprechende DNS-Sequenzen und auch die transkribierte RNS in der Zelle relativ häufig vorhanden sind.

Die Grundlage für eine Isolierung und damit für eine weitere Charakterisierung der an der Regulation beteiligten Ma-DNS-Moleküle war die Klonierung und anschließende Selektionierung auf Regulationsbeteiligung der klonierten Ma-DNS-Stücke dieser Molekulargewichtsbereiche. Dazu wurden die Bakterienkolonien, die rekombinante Plasmid-DNS mit Ma-DNS-Molekülen des MG-Bereichs 2,1 und 1,8 Kbp beinhalteten, mit P-32-markierter RNS aus Kontroll- und Con A-Zellen gescreent. Die "positiven", rekombinanten Plasmide, die aus diesem Experiment hervorgegangen waren, wurden stufenweise durch Gel- und Dot-Hybridisierung auf ihre Regulationsbeteiligung ausgetestet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, daß Stylonychia seine Genexpression mit Kontrollmechanismen sowohl auf Transkriptions- als auch auf Post-Transkriptions-Ebene regulieren kann.

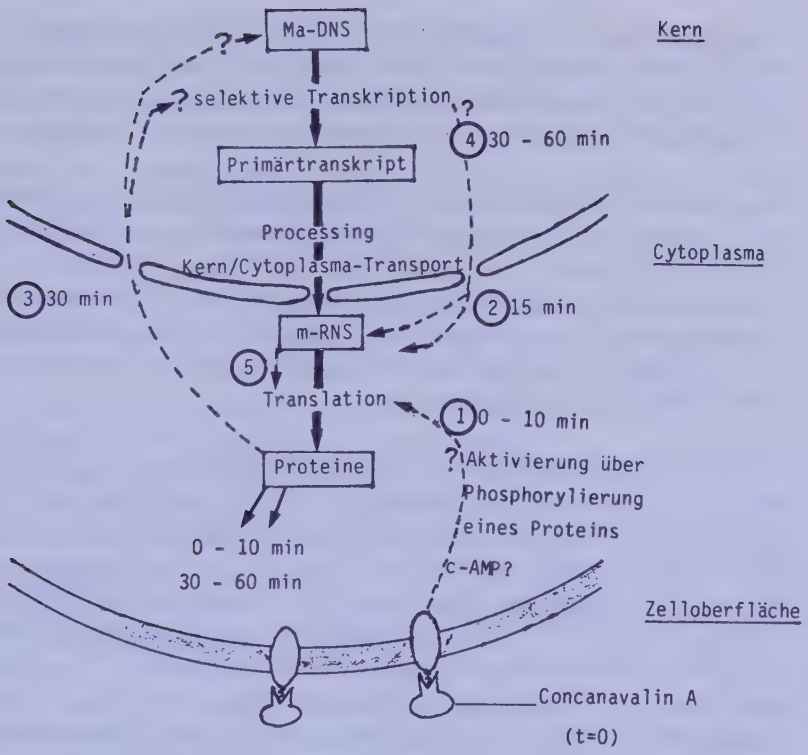


Abbildung 19: Ein teilweise hypothetisches Modell für die Genregulationsvorgänge, wie sie in der Stylonychia-Zelle nach Con A-Behandlung wahrscheinlich ablaufen.
Danach finden Regulationen auf folgenden Ebenen statt:
1) Das Pflanzenlectin Concanavalin A bindet an Oberflächenstrukturen der Zelle, wobei vermutlich über eine gekoppelte Modifikation von Proteinen (z.B. Phosphorylierung) die Translation spezifischer Proteine in den ersten 10 min erhöht wird.
2) Kurzfristig, nach ca. 15 min sinkt für bestimmte Gene die relative RNS-Häufigkeit im Kern. Dies könnte durch einen selektiven Kern-Cytoplasma-Transport für diese RNS-Sorten bewirkt werden.
3) Ein Protein, das relativ früh nach Con A-Behandlung neu synthetisiert und nach 30 min im Kern nachgewiesen wird (Lipps, 1977), könnte in den anschließenden, Con A-spezifischen Transkriptionsanstieg (4) (Lipps und Bessler, 1977; Knowles et al., 1978) verwickelt sein.
In diesem Zusammenhang werden wahrscheinlich auch die beiden Gene selektiv transkribiert, für die hier ein relativer m-RNS-Anstieg nachgewiesen wird.
5) Für eines dieser Gene, das α-Tubulin-Gen, ist mit dem m-RNS-Anstieg auch ein Protein-Syntheseanstieg verbunden.

Diese Möglichkeit, auf verschiedenen Ebenen die Genexpression zu kontrollieren, scheint in den Fällen sinnvoll, in denen es um eine für die Zelle lebenswichtige, schnelle Antwort geht, wie es z.B. DiDomenico et al., 1982, auch für Drosophila nach Einwirken eines Hitzeschocks zeigen konnten.

Die selektive Proteinsynthese innerhalb der ersten 10 min nach Behandlung von Stylonychia mit Concanavalin A beruht sicherlich auf einem Prozess der Posttranskriptionskontrolle. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, daß innerhalb dieses kurzen Zeitraums noch kein genereller RNS-Synthese-Anstieg zu verzeichnen ist, und auch z.B. für die identifizierten Tubulin-Proteine zum Zeitpunkt des Proteinsynthese-Anstiegs die relative α-Tubulin-m-RNS-Konzentration nicht erhöht ist.

Aufgrund der vorliegenden Daten kann nicht entschieden werden, ob es sich bei der Post-Transkriptionskontrolle um eine selektive Verschiebung spezifischer m-RNS von der Monosomen- und Informosomen-Fraktion in die Polyribosomenfraktion handelt. In einem zur Pellicularegeneration von Stylonychia vergleichbaren Vorgang, der Cilienregeneration bei Tetrahymena, konnte trotz differentieller Proteinsynthese kein selektives Aufladen von m-RNS auf die Polyribosomen nachgewiesen werden (Calzone et al., 1983 a). Spezifische Translationskontrollfaktoren wie sie für Drosophila nachgewiesen sind (Krüger et al., 1981; Lindquist, 1981), könnten ebenfalls zu einer gesteigerten Translationsrate spezifischer m-RNS führen.

Sowohl 10 min Con A-Behandlung als auch ein schwacher (35°C) Hitzeschock veranlassen Stylonychia lemnae eine identische Gruppe von Proteinen (S1, S2) verstärkt zu synthetisieren, wie nach Pulsmarkierung und zwei-dimensionaler Elektrophorese hier gezeigt werden konnte.

Dieses Phänomen, auf einen dramatischen Wechsel von externen Einflüßen und scheinbar unabhängig von ihrer Art mit einer spezifisch verstärkten Proteinsynthese zu reagieren, zeigen viele andere Eukaryonten. So reagieren Tetrahymena auf Hitzeschock, Deciliation und Sauerstoffmangel innerhalb von

10 bis 20 min (Guttmann et al., 1980), Drosophila nach Hitzeschock innerhalb von 10 min (Mirault et al., 1978; Sanders, 1981) und Dictyostelium nach Hitzeschock und hoher Zelldichte (Ashburner und Bonner, 1979; Zucker et al., 1983) mit verstärkter Proteinsynthese einer jeweils vergleichbaren Proteingruppe. Diese Streßreaktion scheint eine stabilisierende Antwort auf den Wechsel externer Einflüße zu sein, deren physiologische Bedeutung bisher allerdings unbekannt ist.

Eine eindeutige Lokalisation dieser Streßproteine in der Stylonychia-Zelle und daraus folgende Anhaltspunkte über deren mögliche Funktionen konnte bisher nicht gezeigt werden. Obwohl im SDS-Gel parallel aufgetrennte Kern-Proteine und die charakteristischen Eigenschaften wie MG und IEP darauf hinweisen, daß es sich u.a. um die Histone H2A handeln könnte. Dieser Unterschied tritt stärker auf, wenn die Zellen gleichzeitig hungern. Für eine selektive Histon-Proteinsynthese sprechen auch die Beobachtungen von Bessler und Lipps, 1976, wonach sich die Zahl der Mikro- und Makronuclei nach Con A-Behandlung von Stylonychia erhöht. Für Drosophila wurde eine differentielle Synthesesteigerung des Histon-Gens H2B unter Steßbedingungen beobachtet (Sanders, 1981).

Vorläufige Ergebnisse sprechen auch dafür, daß das kurz nach Con A- und Hitzeschock-Einwirkung synthetisierte Streßprotein S1 sich im Kern anhäuft.

Die Induktion der Proteinsynthese nach Con A-Behandlung tritt bei hungernden Zellen stärker in den Vordergrund als bei wachsenden Zellen. Dies mag wohl damit zusammenhängen, daß bei wachsenden Zellen die Regenerationsleistungen aus einem Pool vorhandener Proteine erbracht werden können. Diese Tatsache wird ein wichtiger Anhaltspunkt für weiterführende Untersuchungen der Kontrollmechanismen der Genexpression bei Stylonychia sein.

Im Rahmen von Cilienregenerationen konnten bisher zwei Regulationsprinzipien gefunden werden. Eine Autoregulation der Tubulin-Synthese auf nichttranskriptioneller Ebene beschrieben Cleveland und Havercroft, 1983. In diesem Regelkreis wird der Pool

nichtpolymerisierten Tubulins im Cytoplasma gemessen, und als Gegenregulation findet ein selektiver Tubulin-m-RNS-Transport vom Kern ins Cytoplasma statt.

Für Chlamydomonas (Weeks, 1977) und für einige andere Organismen kann jedoch eine Feed-back-Reaktion im Sinne eines Auffüllens des unpolymerisierten Tubulins nicht nachgewiesen werden, wobei die Induktion der Tubulin-Synthese auf Transkriptionsebene und völlig unabhängig vom vorhandenen Tubulin-Pool abläuft (Keller et al., 1984).

Die vorliegenden Daten, wie Anstieg der relativen m-RNS-Konzentration spezifischer Gene nach Con A-Behandlung der Zellen, der mit einem allgemein ansteigenden H-3-Uridin-Einbau verbunden ist, unterstützen auch die bereits vorliegenden Daten (Knowles et al., 1978; Lipps, 1977), daß eine Kontrolle der Genexpression für Stylonychia auf Transkriptionsebene möglich ist. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Isolierung eines zum α-Tubulin-Gen koordiniert regulierten Gens können zukünftig die nichtcodierenden Regionen dieser Ma-DNS-Moleküle auf eventuelle Sequenzhomologien untersucht werden.

Bei einer Reihe von Genen innerhalb anderer Organismen wie z.B. Drosophila (Karch et al., 1981; Bonner et al., 1984), Dictyostelium (Zucker et al., 1983) und HeLa-Zellen (Karin et al., 1984) sind Promotorsequenzen charakterisiert worden, die für eine koordinierte Genexpression verantwortlich zu sein scheinen.

Jedoch ist eine exakte Sequenzhomologie entsprechender Promotoren nicht in allen Fällen erforderlich. Die von Pelham und Bienz, 1982, konstruierten Hitzeschock-Promotoren zeigten im Transformationssystem auch dann noch ihre volle Aktivität, wenn von den 15 Basen nur 8 übereinstimmten, wobei keine einzige Übereinstimmung in der Basenposition absolut essentiell war. Die Palindrom-Struktur dieser Sequenzen scheint essentiell für deren Funktion zu sein.

Für den Test derartiger Regulator-Sequenzen bei Stylonychia stellt die kürzlich entwickelte DNS-vermittelte Transformation bei Stylonychia (Wünning und Lipps, 1983) ein ausgezeichnetes System dar.

Jedoch müssen für eine koordinierte Transkriptionsregulation nicht zwingend Sequenzhomologien vorhanden sein. Wird vorausgesetzt, daß eine Protein-DNS-Interaktion an der Transkriptionskontrolle beteiligt ist, - und dafür sprechen die Ergebnisse der letzten Jahre (z.B. Wu, 1984) - , beweisen dies wenig homologe DNS-Sequenzen, die dieselbe Proteinklasse zu binden vermögen (Myers et al., 1981; Nowock und Sippel, 1982). Für eine derartige Bindung sind drei-dimensionale DNS-Strukturen verantwortlich. Für zukünftige Untersuchungen der Transkriptionsregulation bei Stylonychia könnten Protein/DNS-Bindungsstudien weiterführende Erkenntnisse bringen, zumal Lipps, 1977, nachgewiesen hat, daß sich im Makronucleus von Stylonychia die Zusammensetzung der Nicht-Histon-Proteine in Abhängigkeit vom Aktivitätszustand der Zelle ändert. Im Falle der Stimulierung der Zelle durch Concanavalin A werden ein oder mehrere Proteine mit einem MG von 52 KD nach 30 min in den Makronucleus geschleust (Lipps, 1977). Eine vermutete Verwicklung in die Transkriptionsregulation wird durch den darauf folgenden und eine halbe Stunde weiter andauernden RNS-Synthese-Anstieg unterstützt.

Bei der Entwicklung der Ma-DNS-Moleküle aus dem transkribtionsinaktiven Mikronucleusgenom werden DNS-Sequenzen eliminiert, umstrukturiert und vermutlich selektiv amplifiziert (Ammermann et al., 1974). Diese Vorgänge lassen vermuten, daß bei den Stylonychia-Arten teilweise schon auf DNS-Ebene Prozesse ablaufen, die bei anderen Eukaryonten erst während der Transkription und des Processings der Primärtranskripte zu finden sind.

Jedoch finden sich auch bei Stylonychia, - trotz der umfangreichen DNS-Umstrukturierungen (Ammermann et al., 1974) -, Regulationsmechanismen auf RNS-Ebene. Für die fünf hier untersuchten Gene konnte nachgewiesen werden, daß die jeweilige RNS-Kopienzahl in einer Zelle unabhängig von der entsprechenden Ma-DNSx-Kopienzahl ist. Die jeweiligen

DNSx/RNSx-Kopienzahlverhältnisse variieren zwischen 1 : 0,14 und 1 :3,1. D.h. die Variationsbreite für genspezifische m-RNS-Kopienzahlen, die auf die jeweiligen Ma-DNS-Kopienzahlen normiert sind, liegt bei einem Faktor 22. Diese Werte beziehen sich auf nicht wachsende Zellen, deren Gesamt-RNS-Gehalt hier bestimmt wurde. Diese unterschiedlichen DNSx/RNSx-Kopienzahlverhältnisse deuten darauf hin, daß Stylonychia auch auf Kontrollmechanismen der Genexpression zurückgreifen kann, die auf einer unterschiedlichen Transkriptionsrate einzelner Gene oder auf unterschiedlicher Lebensdauer der m-RNS-Sorten beruht.

Die selektive Amplifikation als eine Möglichkeit, die Transkriptionsraten von Genen aufgrund eines Stimulus zu variieren, konnte in den letzten Jahren für eine Reihe von Fällen aufgezeigt werden. Für diese vermutlich selten verwirklichte Transkriptionskontrollmechanismen seien als Beispiele angeführt, das Dihydrofolat-Reductase-Gen (Methotrexat-Resistenz) in Mäuse-Zellkulturen (Schimke, 1980) und die vermutlich selektive DNS-Amplifikation in Stentor coeruleus (Pelvat, 1984), die Voraussetzung für die Regeneration des Mundfeldes ist. Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene, deren m-RNS im Verlauf der Pellicularegeneration von Stylonychia lemnae ansteigt, kann eine selektive Amplifikation dieser Ma-DNS-Moleküle innerhalb 6 Stunden nach Kontakt mit Concanavalin A ausgeschlossen werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen an dem Ciliaten Stylonychia lemnae zur Genexpression auf DNS-, RNS- und Proteinebene beschrieben.

Die Ergebnisse legen nahe, daß dieser Einzeller seine Genexpression nach Concanavalin A-Behandlung sowohl auf Transkriptions- als auch auf Posttranskriptionsebene regulieren kann.

Filterhybridisierungen zeigen quantitative m-RNS-Unterschiede zwischen Kontroll- und Con A-Zellen für Gen-große Ma-DNS-Stücke bestimmter Molekulargewichtsbereiche. Diese angereicherten und im Vektor pBR 322 klonierten Ma-DNS-Stücke werden auf ihre Beteiligung an der Regulation im Fall von Concanavalin A-behandelten Zellen selektioniert. Von den ca. 500 klonierten, Gen-großen Ma-DNS-Stücken kann für zwei (u.a. das α-Tubulin-Gen) anhand einer zeitabhängigen RNS-Konzentrationsmessung (Dothybidisierungen) gezeigt werden, daß deren relative m-RNS-Häufigkeit im Verlauf der Pellicularegeneration ansteigt. Als Vergleich dienen klonierte Ma-DNS-Stücke, deren m-RNS-Konzentrationen über den angegebenen Zeitraum annähernd konstant bleiben.
Zusätzlich ergeben sich aufgrund eines Absinkens der relativen Kern-RNS-Häufigkeiten Hinweise, daß auch ein selektiver Transport einzelner m-RNS-Typen vom Kern ins Cytoplasma an der Regulation beteiligt sein könnte.

Eine selektive DNS-Amplifikation als eine Möglichkeit, die Transkriptionsraten der hier untersuchten Gene zu variieren, kann aufgrund entsprechender Ma-DNS/DNSx-Hybridisierungen ausgeschlossen werden.

Da die jeweiligen m-RNS-Mengen von Stylonychia auch von der Anzahl der zugehörigen identischen DNS-Kopien abhängen könnte, wird für fünf untersuchte Gene das jeweilige DNS/RNS-Kopienzahlverhältnis bestimmt. Es ergibt sich jedoch, daß die Anzahl der m-RNS-Kopien keinesfalls proportional zur Anzahl der DNS-Kopien ist. Die maximale Variationsbreite

der auf die zugrundeliegende DNS normierte m-RNS-Kopienzahlen beträgt etwa einen Faktor 22.

Ein zeitlich differentieller Verlauf der Proteinsynthese nach Concanavalin A-Behandlung der Zellen wird durch ein- und zwei-dimensionale Elektrophorese analysiert. Eine markante selektive Proteinsynthese in den ersten 10 min nach Concanavalin A-Behandlung läßt den Schluß einer Post-Transkriptionskontrolle zu, da innerhalb dieses kurzen Zeitraums noch kein genereller RNS-Synthese-Anstieg zu verzeichnen ist.

Zu den Con A-behandelten Zellen parallele Proteinuntersuchungen an Zellen, die einem leichten (35°C) Hitzeschock ausgesetzt werden, zeigen, daß dieser dramatische Wechsel externer Einflüße mit einer verstärkten Synthese derselben Proteingruppe wie im Con A-Fall einhergeht.

Durch eine immunenzymatische Methode werden die Tubulin-Proteine im Gesamt-Proteinmuster von Stylonychia nach ein- und zwei-dimensionaler Elektrophorese identifiziert. Dadurch konnte ein zeitlicher Bezug zwischen Tubulin-Proteinsynthese und vorhandener genspezifischer m-RNS hergestellt werden.

6. ABKÜRZUNGEN

A.bidest.	bidestilliertes Wasser
AS	Ammoniumperoxodisulfat
ATA	Aurintricarbonsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat X Na2-Salz
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Temperatur in Grad Celcius
Ci	Curie
cm	Zentimenter
Con A	Concanavalin A (Pflanzenlectin)
Con A-Zellen	Stylonychia lemnae-Zellen, die mit Con A behandelt wurden
cpm	gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute
CsCl	Cäsiumchlorid
D	Dalton (= Masse eines Wasserstoffatoms = $1{,}67 \times 10^{-12}$g)
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-triphoshat
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-triphoshat
DEP	Diäthylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DNSx	bestimmtes Ma-DNS-Genstück
dpm	wirklichen radioaktiven Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli (Bakterium)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
g	Gramm oder Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Kbp	Kilobasenpaare (Nucleotide)
K+ EDTA	Kaliumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure

M	Molar
mA	Milliampere
Ma	Makronucleus
Mi	Mikronucleus
n	Brechungsindex bei 25°C, D-Linie (Refraktometer)
NTP	Nucleotidtriphosphate
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MMS-Virus	Moloney murine sarcoma virus
m-RNS	Messenger RNS
NC	Nitrocellulose
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
~~ø~~	Durchmesser, Mittelwert
OD	Optische Dichte (1 OD entspricht einer Extinktion von 1)
P-32	Radioaktives Isotop des Phosphors mit einer Halbwertszeit von 14,3 Tagen (1,7 MeV)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
pg	Pikogramm
PolyA+-RNS	Messenger RNS mit einem Polyadenylsäureende
r-DNS	Desoxyribonucleinsäure-Sequenz, die die Gene für die ribosomale RNS codiert
rpm	Umdrehungszahl pro Minute
RNase	Ribonuclease
RNS	Ribonucleinsäure
RNSx	RNS eines bestimmten Gens
r-RNS	ribosomale RNS

S-35	radioaktives Isotop des Schwefels mit einer Halbwertszeit von 90 Tagen
S	Svedberg (Sedimentationskonstante)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standart Saline Citrate = 0,15 M NaCl und 0,015 M Natriumcitrat
SV 40	Simian vaculating virus (Papovavirus)
TCA	Trichloressigsäure
TMV	Tabakmosaikvirus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t-RNS	Transfer RNS
V	Volt
Vol	Volumen (Volumina)
v/v	Volumenprozente
w/v	Gewichtsprozente
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

CHEMIKALIEN

Alle nicht anders erwähnten Substanzen und Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, mit dem Reinheitsgrad "zur Analyse" bezogen.

Enzyme:

Alkal. Phosphatase aus Kälberdarm, Grad I, Boehringer,M.
DNase I, RNase frei, Bethesda Research Lab. (BRL)
DNA-Polymerase I, Boehringer,M. oder BRL
Proteinase K aus Pilzen, Merck
T 4 Polynucleotid-Kinase, BRL
RNase T1 und RNase A aus Pankreas, Merck
Restriktionsenzyme (Eco RI, Hind III, Pst I), BRL und Boehringer,M.

Radioaktive Substanzen:

1. Adenosine 5'-(γ-P-32)Triphosphate, Triethylammonium Salt in stabilized aqueous solution; spezifische Aktivität: 5.000 Ci/mmol, Amersham-Buchler
2. α-P-32-dCTP, spezifische Akivität: 2.000 - 3.000 Ci/mmol, Amersham-Buchler oder NEN.
3. L-S-35-Methionine in 20 mM potassium acetate solution containing 0,1 % 2-Mercaptoethanol, spezifische Akivität 600 - 900 Ci/mmol, Amersham-Buchler.

Weitere Materialien:

Acrylamid, Serva, Feinbiochemica, Heidelberg
Agarose (low melting), BRL
Ampholine:
1. Servalyt pH= 2 - 11, analyt. grade, 40 %ige Lösung, Serva
2. Servalyt AG pH = 5 - 7, analyt. grade, 40 %ige Lösung, Serva
3. Ampholine pH = 3,5 - 10, LKB Aminkemi 1809-101, LKB Bromma

Antibiotika, Serva Coomassie brillant-blue R250, Serva
Dialyseschläuche, Serva
DNS aus Kalbsthymus, Serva
E.coli t-RNS MRE600, Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid, Serva
Ficoll, Pharmacia Fine Chemicals
Ionenaustauscher (AG-501-X8), Bio-Rad
N,N'-Methylenbisacrylamid, Serva
Polyvinylpyrrolidon PVP-10, Sigma
Rinderserumalbumin, Serva
Sephadex G 50-fine, Pharmacia Fine Chemicals
SDS (Sodiumdodecylsulfate), Bio-Rad
Spermidinphosphat, Sigma
TEMED, Serva
Unisolve (Scintillationsflüssigkeit), Zinsser, Frft.

Filter:

Nitrocellulose BA 85, 0,45 µm, Schleicher und Schüll
PALL Biodyne A Transfer Membranes, PALL-Ultrafine
Filtr. Corp.

Immunglobuline:

PAP (Rabbit), Swine Anti Rabbit- und Goat-Anti-Rabbit-Serum
DAKO Immunglobulins, Dänemark

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ammermann, D. (1965): Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten Stylonychia mytilus Ehrenberg. Arch. Protistenk., 108, 109 - 152

Ammermann, D. (1970): The micronucleus of the Ciliate Stylonychia mytilus; its Nucleis Acid Synthesis and its Funktion. Exp. Cell Res., 61, 6 - 12

Ammermann, D., G. Steinbrück, L. v. Berger and W. Henning (1974): The Development of the Macronucleus of the Ciliated Protozoan Stylonychia mytilus. Chromosoma (Berl.), 45, 401 - 429

Ammermann, D., G. Steinbrück, R. Baur and H. Wohlert (1981): Methylated bases in the DNA of the ciliate Stylonychia mytilus. Eur. J. Cell Biol., 24, 154 - 156

Ammermann, D. and Schlegel, M. (1983): Characterization of Two Sibling Species of the Genus Stylonychia (Ciliata, Hypotricha): S. mytilus Ehrenberg, 1838 and S. lemnae n. sp. I. Morphology and Reproductive Behavior. J. Protozooloy, 30 (2), 290 - 294

Bannon, G.A., F.J. Calzone, J.K. Bowen, C.D. Allis and M.A. Gorovsky (1983): Multiple, independently regulated, polyadenylated messages for histone H3 and H4 in Tetrahymena. Nucl. Acids Res., 11, 3903 - 3917

Bathurst, I.C. and M.G. Smith (1982): Separation and Characterization of Low-molecular-weight Nuclear RNA Species That Inhibit Cell-Free Protein Synthesis. Biochim. Biophys. Acta, 699, 84 - 91

Berridge, M.V., S.R. Farmer, C.D. Green, E.C. Henshaw and J.R. Tata (1976): Characterization of Polysomes from Xenopus Liver Synthesizing Vitellogenin and Translation of Vitellogenin and Albumin Messenger RNA's in vitro. Eur. J. Biochem., 62, 161 - 171

Beck, H.P., E.M. Schneider, B. Wallenfels, H.J. Lipps, H. Schott, H. Sonneborn and P. Wernet (1984): Isolation and functional property of mRNAs coding for human interleukin 2. Cell Biol. Internat. Rep., 8, No. 3, 193 - 205

Bessler, W.G. and H.J. Lipps (1976): Concanavalin A-induced NuclearDivision in Stylonychia mytilus. J. Gen. Microbiol., 92, 221 - 223

Birnboim, H.L. and Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedur for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Acids Res., 7, 1513 - 1523

Blackburn, P. and B.L. Jailkhani (1979): Ribonuclease Inhibitor from Human Placenta: Interaction with Derivates of Ribonuclease A. J. Biol. Chem., 254, 12488 - 12493

Bonner, J.J., C. Parks, J. Parker-Thornburg, M.A. Martin and H.R.B. Pelham (1984): The Use of Promotor Fusions in Drosophila Genetics: Isolation of Mutations Affecting the Heat Shock Response. Cell, 37, 979 - 991

Bonner, W.M. and R.A. Lasky (1974): A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels. Eur. J. Biochem., 46, 83 - 88

Brown, D. (1981): Gene Expression in Eukaryotes Science, 211, 66 - 674

Buell, N., Wickens, F. Payuvar, R. Schimke (1977): Synthesis of Full Length c-DNAs from Four Partially Purified Ovidukt mRNAs. J. Biol. Chem., 253, 2471 - 2482

Burnette, N.W. (1981): "Western Blotting": Elektrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein. A. Anal. Biochem., 112, 195 - 203

Burton, K. (1965): A Study of Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. Biochem. J., 62, 315 - 323

Calzone, F.J., R. Angerer and M.A. Gorovsky (1983) a: Regulation of Protein Synthesis in Tetrahymena. J. Biol. Chem., 258, 6887 - 6898

Calzone, F.J., Stathopoulos, V.A., Grass, D., Gorovsky, M.A. and R.C. Angerer (1983) b: Regulation of Protein Synthesis in Tetrahymena. J. Biol. Chem., 258, 6899 - 6905

Cartinhour, S.W. and G.A. Herrick (1984): Three Different Macronuclear DNAs in Oxytrichia fallax Share a Common Sequence Block. Mol. Cell. Biol., 4, 931 - 938

Chaconas, G. and Sande, J.A. van de (1980): 5'- P^{32}Labling of RNA and DNA restrictionfragments. Methods Enzymol., 65, 75

Clark,J. and R. Sitzer (1977): Experimental Biochemistry. Sec. Ed. Freemann and Comp., San Fransisco

Cleveland, D.W. (1983): The Tubulins: From DNA to RNA to Protein and Back Again. Cell, 34, 330 - 332

Cleveland, D.W. and J.C. Havercroft (1983): Is apparent autoregulatory control of tubulin nontranscriptionally regulated? J. Cell. Biol., 97, 919 - 924

Clewell, D.B. (1972): Nature of Col E1 plasmid replication in the presence of chloramphenicol. J. Bacteril.,110, 667 - 676

Cohen, J., A. Adoutte, S. Grandchamp, L.M. Houdebine and J. Beisson (1982): Immunocytochemical Study of Microtubular Structures Throught the Cell Cycle of Paramecium. Biol. Cell, 44, 35 - 44

Dagert, M. and S.D. Ehrlich (19): Prolonged incubation in calciumchloride improves the competence of E.coli cells. Gene, 6, 23 - 28

Darnell, J.E. (1982): Variety in the level of gene control in eucaryotic cells. Nature, 297, 365 - 371

Davis, Botstein, Roth (1980): A Manuel for Genetic Engineering Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Lab., New York

Denhard, D.J. (1966): A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 641 - 646

DiDomenico, B.J., G.E. Bugaisky and S. Lindquist (1982): The heat shock response is selfregulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. Cell 31, 593 - 603

Donis-Keller, H., A. Maxam and W. Gilbert (1977): Mapping adenins, guanises and pyridines in RNA. Nucl. Acids Res., 4 2527 - 2538

Dollak, H. (1982): Untersuchungen zum Hitzeschock bei dem Ciliaten Stylonychia mytilus. Dissertation am Fachbereich Biologie an der Universität Tübingen.

Dudley, K. and D.H. Northcote (1978): Comparison of the in vitro Translation Products of mRNA Isolated from Suspension Cultures of Phaseolus vulgaris Grown on Maintenance and Induction Medium. Planta, 138, 41 - 48

Dynan, W.S. and R. Tjian (1983): Isolation of Transcription Factors That Discriminate between Different Promotors Recognized by RNA Polymerase II. Cell, 32, 669 - 680

Elsevier, S.M., H.J. Lipps and G. Steinbrück (1978): Histone Genes in Macronuclear DNA of the Ciliate Stylonychia mytilus. Chromosoma (Berl.), 69, 291 - 306

Forney, J.D., L.M. Epstein, L.B. Preer, B.M. Rudman, D.J. Widmayer, W.H. Klein and J.R. Preer (1983): Structure and Expression of Genes for Surface Proteins in Paramecium. Mol. Cell. Biol., 3, 466 - 474

Frisch, A., W. Bessler, H.J. Lipps and D. Ammermann (1976): Immobilization of Ciliates by Concanavalin A. J. Protozool., 23, 427 - 430

Fritton, H.P., T. Igo-Kemenes, J. Nowock, M. Strech-Jurk, M. Theisen and A.E. Sippel (1984): Alternative sets of DNase I-hypersensitive sites characterize the various functional states of the chicken lysozyme gene. Nature, 311, 163 - 165

Galau, G., M. Smith, R.J. Britten and E. Davidson (1977): Studies on nucleic acid reassociation kinetics: Retarded rate of hybridization of RNA with excess DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 2306 - 2310

Gall, J.G. (1984): Ciliates come of age. Nature, 310, 453 - 454

Garrels, J.J. (1983): Quantitative Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins. Methods Enzymol., 100B, 411 - 423

Giles, K.W. and A. Myers (1965): A Improved Diphenylamine Method for the Estimation of Deoxyribonucleic Acid. Nature, 206, 93

Gilles, S.D., S.L. Morrison, V.T. Oi and S. Tonegawa (1983): A Tissue-specific Transcription Enhancer Element Is located in the Major Intron of a Rearranged Immunglobulin Heavy Chain Gene. Cell, 33, 717 - 728

Glisin, V., R. Crkvenjakov, C. Byus (1974): Ribonucleic Acid Isolated by Cesium Chloride Centrifugation. Biochemistry, 13, 2633 - 2637

Grundstein, M., and J. Wallis (1979): Colony Hybridization. Methods Enzymol., 68, 379 - 389

Gurdon, J.B., C.D. Lane, H.R. Woodland and G. Marbaix (1981): Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. Nature, 233, 177 - 182

Guttmann, S.D. and M.A. Gorovsky (1979): Cilia Regeneration in Starved Tetrahymena: an Inducible System for Studying Gene Expression and Organelle Biogenesis. Cell, 17, 307 - 317

Guttmann, S.D., C.V.C. Glover, C.D. Allis and M.A. Gorovsky (1980): Heat Shock, Deciliation and Release from Anoxia Induce the Synthesis of the Same Set of Polypeptides in Starved T.pyriformis. Cell, 22, 299 - 307

Hallick, R.B., B.K. Chelm, P.W. Gray and E.M. Orozco jr. (1977): Use of Aurintricaroxylic Acid as an Inhibitor of Nucleases During Nucleic Acid Isolation. Nucl. Acids Res., 4, 3055 - 3064

Helftenbein, E. (1984): Nucleotide sequence of a macronuclear DNA molecule coding for α-tubulin from the ciliate Stylonychia lemnae. Special codon usage: TAA is not a translation termination codon. Nucl. Acids Res., (zur Publikation eingereicht)

Holmes, D. and M. Quigley (1981): A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids. Anal. Biochem., 114, 193 - 197

Hunter, T. (1984): The epidermal growth factor receptor gene and its product. Nature, 311, 414 - 416

Kafatos, F.C., C.W. Jones and A. Efstradiadis (1979): Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. Nucl. Acids Res., 7, 1541 - 1552

Karch, F., J. Török and A. Tissieres (1981): Extensive Regions of Homology in Front of the Two hsp 70 Heat Shock Variant Genes in Drosophila melanogaster. J. Mol. Biol., 148, 219 - 230

Karin, M., A. Haslinger, H. Holdgreve, R.I. Richards, P. Krauter, H.M. Westphal, M. Beato (1984): Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induces human metallothionein-IIa gene. Nature, 308, 513 - 519

Kavenoff, R. and Zimm, B.H. (1973): Chromosome-Sized DNA Molecules from Drosophila. Chromosoma (Berl.), 41, 1 - 27

Keller, L.R., J.A. Schloss, C.D. Silflow and J.L. Rosenbaum (1984): Transcription of α- and β-Tulbulin Genes In Vitro in Isolated Chlamydomonas reinhardi Nuclei. J. Cell Biol., 98, 1138 - 1143

Khoury, G. and R. Gruss (1983): Enhancer Elements. (Review) Cell, 33, 313 - 314

King, J., Laemmli, U.K. (1971): T 4 Tail Fibre Proteins. J. Mol. Biol., 62, 462 - 466

Kirby, K.S. (1968): Isolation of Nucleic Acids with Phenolic Solvents. In: Methods in Enzymology 12, 87 - 99, Ed. by: L. Grossman and K. Moldave, Academic Press Inc., New York

Klein, G. (1983): Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. Cell, 32, 311 - 315

Knowles, J.K.C., H.J. Lipps, A. Nock (1978): Translation of Homologous RNA Injected Into The Ciliate Stylonychia mytilus. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 897 - 904

Kozak,M. (1978): How Do Eucaryotic Ribosomes Select Initiation Regions in Messenger RNA? (Review) Cell, 15, 1109 - 1123

Kühn, B., A. Villinger, H. Falk and P.C. Heinrich (1982): Inhibition of Cell-Free Protein Synthesis by Low molecular weight RNAs from Free Cytoplasmic Ribonucleoprotein Particles. Eur. J. Biochem., 126, 181 - 188

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of Stuctural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227, 680 - 685

Laimins, L.A., G. Khoury, C. Gorman, B. Howard, and P. Gruss (1982): Host specific activation of transcription by tandem repeats from simian virus 40 and Moloney murine sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6453 - 6457

Landfear, S.M. and D.F. Wirth (1984): Control of tubulin gene expression in the parasitic protozoan Leishmania enrietti. Nature, 309, 716 - 714

Lasky, R.A. and A.D. Milles (1975): Quantitative Film Detection of H-3 and C-14 in Polyacrylamide Gels by Fluorography. Eur. J. Biochem., 56, 335 - 341

Lehrach, H., D. Diamand, J.M. Wozney and H. Boedtker (1977): RNA Molecular Weight Determinations by Gel Electrophoresis under Denaturing Conditions, a Critical Reexamination. Biochemistry, 16, 4743 - 4751

Lewin, B. (1980): Gene Expression. Vol. 2, 2nd edn (Wiley,N.Y.)

Lipps, H.J. and W. Bessler (1977): Early Nuclear Events Following The Interaction Of The Ciliate Stylonychia Mytilus With The Plant Lectin Concanavalin A. Cell Diff., 6, 187 - 197

Lipps, H.J. (1977): An Analysis of the Phenol-soluble Nuclear Proteins on the Ciliate Stylonychia mytilus. Cell Diff., 6, 17 - 24

Lipps, H.J., A. Nock, M. Riewe and G. Steinbrück (1978): Chromatin structure in the macronucleus of the ciliate Stylonychia mytilus. Nuc. Acids Res., 5, 4699 - 4709

Lipps, H.J. and G. Steinbrück (1978): Free Genes for r-RNA's in the Macronuclear Genome of the Ciliate Stylonychia mytilus. Chromosoma (Berl.), 69, 21 - 26

Lipps, H.J., Nordheim, A., Lafer, E.M., Ammermann, D., Stollar D.B. and Rich, A. (1983): Antibodies against Z-DNA React with the Macronucleus but Not the Micronucleus of the Hypotrichous Ciliate Stylonychia. mytilus. Cell, 32, 435 - 441

Makino, R, K. Hayashi and T. Sugimura (1984): C-myc transcript is induced in rat liver at a very early stage of regeneration or by cycloheximide treatment. Nature, 310, 697 - 698

Mangiarotti, G., A. Ceccarelli and H.F. Lodish (1983): Cyclic AMP stabilizes a class of developmentally regulated Dictyostelium discoideum mRNAs. Nature, 301, 616 - 618

Mandel, M. and Higa, A. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol., 53, 159 - 162

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982): Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Labor.

McKnight, S.L. and R. Kingsbury (1982): Transcriptional Control Signals of a Eucaryotic Protein-Coding Gene. Science, 217, 316 - 324

McMaster, G., G. Carmichael (1977): Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gel by glyoxal and acridine orange. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4835 - 4838

Maizels, N. (1976): Dictyostelium 17 S, 25 S and 5 S r-DNA's lie within a 38000 Base Pair Repeated Unit. Cell, 9, 431 - 438

Mehdy, M.C., D. Ratner and R.A. Firtel (1983): Induction and Modulation of Cell-Type-Specific Gene Expression in Dictyostelium. Cell, 32, 763 - 771

Melli, M., C. Whitfield, K.V. Rao, M. Richardson and J.O. Bishop (1971): DNA/RNA Hybridization in Vast DNA Excess. Nature New Biology, 231, 8 - 12

Meyer, G.F. and H.J. Lipps (1980): Chromatin Elimination in the Hypotrichous Ciliate Stylonychia mytilus. Chromosoma (Berl.), 77, 285 - 297

Myers, R.M., Rio, D.C., Robbins, A.K. and Tjian, R. (1981): SV40 gene expression is modulated by the cooperative binding of T antigen to DNA. Cell, 25, 373 - 384

Nock, A. (1979): Untersuchungen zur RNS des Ciliaten Stylonychia Mytilus. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Tübingen.

Nock, A. (1981): RNA and Macronuclear Transkription in the Cilitate Stylonychia mutilus. Chromosoma (Berl.), 83, 209 - 220

Novogrodsky, A., M. Tal, A. Traub, J. Hurqitz (1966): The Enzymatic Phosphorylation of Ribonucleic Acid and Deoxyribonuclei Acid. J. Biol. Chem., 241, 2933 - 2943

O'Farrell, P. (1975): High Resolution Two-Dimensional Electrophorese of Proteins. J. Biol. Chem., 250, 4007 - 4021

O'Farrell, P.Z., H.M. Goodmann and P.H. O'Farrell (1977): High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Basic as Well as Acidic Proteins. Cell, 12, 1133 - 1142

Palacios, R., R. Palmiter, R. Schimke (1972): Identification of Ovalbumin-synthesizing Polysomes. J. Biol. Chem., 247, 2316 - 2321

Pelham, H.R.B. and R.J. Jackson (1976): An efficient mRNA dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur. J. Biochem., 67, 247 - 256

Pelvat, B.(1984): DNA synthesis and oral regeneration in Stentor-coeruleus. Rev. Suisse Zool., 90 (4), 829 - 846

Penman, S. (1969): Preparation of Purified Nuclei and Nucleoli from Mammalian Cells. In: Fundamental techniques in Virology, 35 - 47. Ed. by: K. Habel, N.P. Salzman, Acad. Press , N.Y.

Prescott, D.M., K.G. Murti and C.J. Bostock (1973): Genetic apparatus of Stylonychia sp. Nature, 242, 597 - 600

Radloff, R., W. Bauer, and J. Vinograd (1967): A Dye-Buyont-Density Method for the Detection and Isolation of Closed Circular Duplex DNA: The Closed Circular DNA in HeLa Cells. Proc. Natl. Sci. USA, 57, 1514 - 1521

Rave, N., R. Crkenjakov and H. Boedtker (1979): Identification of procollagen mRNAs transfered to diazobenzyloxymethyl paper from formaldehyde agarose gels. Nucl. Acids Res., 6, 3559 - 3567

Rigby, P.W.J., Diechmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977): Labeling Desoxyribonucleic Acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA Polymerase I. J. Mol. Biol., 113, 237 - 251

Riewe, M. and H.J. Lipps (1977): Template activity of Macronuclear and Micronuclear Chromatin of the Ciliate Stylonychia mytilus. Cell Biol. Inter. Rep., 1,

Rowekamp, W. and Firtel, R.A. (1980): Isolation of developmental regulated genes from Dictyostelium. Dev. Biol., 79, 409

Roychoudhury, R., Jay, E. and Wu, R. (1976): Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. Nucl. Acids Res., 3, 101

Sande, van de J.H., K. Kleppe and H.G. Khorona (1973): Reversal of Bacteriophage T4 Induced Polynucleotide Kinase Action. Biochem., 12, 5050 - 5055

Sanders, M.M. (1981): Identification of Histone H2B as a Heat

Shock Protein in Drosophila. J. Cell Biol., 91, 579 - 583

Sapra, G. and D. Ammermann (1973): RNA Synthesis and Aquisition of Actinomycin D Insensitivity During Conjugation in Stylonychia mytilus. Exp. Cell Res., 78, 168 - 174

Sapra, G.R. and D. Ammermann (1974): An analysis of the development program in relation to RNA metabolism in the ciliate Stylonychia mytilus. Develop. Biol., 36, 105 - 112.

Scherrer, K. (1969): Isolation and Sucrose Gradient Analysis of RNA. In: Fundamental techniques in Virology, 413 - 432 Ed. by: K. Habel, N.P. Salzman, Acad. Press, N.Y., London

Schibler, M., O. Hagenbüchle, Wellauer and Pittet (1983): Two Promotors of Differnt Strengths Control the Transcription of the Mouse Alpha-Amylase gene Amy-1a in the Parotid Gland and the Liver. Cell, 33, 501 - 508

Schimke, R.T. (1980): Gene amplification and drug resistence. Scientific American, 243, Nr. 5, 50 - 59

Schröder, G. and J. Schröder (1982): Hybridization Selection and Translation of T-DNA Encoded mRNAs from Octopine Tumors. Mol. Gen. Genet., 185, 51 - 55

Shinnick, T.M., E. Lund, O. Smithies and F.R. Blattner (1975): Hybridization of Labeled RNA to DNA in agarose gels. Nucl. Acids Res., 2, 1911 - 1929

Silfow, C.D. and J.L. Rosenbaum (1981): Multiple - and - tubulin Genes in Chlamydomonas and Regulation of Tubulin mRNA Level after Deflagellation. Cell, 24, 81 - 88

Simsek, M., J. Ziegenmeyer, J. Heckmann and U.L. Raijbhandary (1973): Absence of the Sequence GTCG in Several Eucaryotic Cytoplasmic Initiator Transfer RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1041 - 1045

Southern, E.M. (1975): Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Elektrophoresis. J. Mol. Biol., 398, 503 - 517

Steinbrück, G., Haas, J., Hellmer, K.H. and Ammermann, D. (1981): Characterization of Macronuclear DNA in Five Species of Ciliates. Chromosoma, 83, 199 - 208

Steinbrück, G. (1983): Overamplification of genes in macronuclei of hypotrichous ciliates. Chromosoma (Berl.), 88, 156 - 163

Steinbrück, G. and Schlegel, M (1983): Characterization of Two Sibling Species of the Genus Stylonychia (Ciliata, Hypotricha): Stylonychia mytilus Ehrenberg, 1838 and Stylonychia lemnae n. sp. II. Biochemical Characterization. J. Protozool., 30 (2), 294 - 301

Thomas, P. (1980): Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transfered to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5201 - 5205

Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic Transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350 - 4354

Wallach, M., D. Fong and K.P. Chang (1982): Post-transcriptional control of tubulin biosynthesis during leishmanial differentiation. Nature, 299, 650 - 652

Weeks, D.P., P.S. Collis and M.A. Gealt (1977): Control of induction of Tubulin synthesis in Chlamydomonas reihardi. Nature, 268, 667 - 668

Weisbrod, S. (1982): Active Chromatin. (Review) Nature, 297, 289 -295

Wenzler, C. (1982): Untersuchungen zur Struktur und Transkription der r-RNS-Gene des Ciliaten Stylonychia mytilus. Diplomarbeit in der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.

White, B. and F.C. Bancroft (1982): Cytoplasmic Dot Hybridization. J. Biol. Chem., 257, 8569 - 8572

Wieslander, L. (1979): A Simple Method to Recover Intact High Molecular Weight RNA and DNA after Electrophoretic Separation in Low Gelling Temperature Agarose Gel. Analyt. Biochem., 98, 305 - 309

Williams, J.G., M.M. Lloyd and J.M. Devine (1979): Chracterization and Transcription Analysis of a Cloned Sequence Derived from a Major Developmentally Regulated mRNA of D. discoideum. Cell, 17, 903 - 913

Wu, C. (1984): Two protein-binding sites in chromatin implicated in the activation of heat-shock genes. Nature, 309, 229 - 234

Wünning, J. and H.J. Lipps (1983): A transformation system for the hypotrichous ciliate Stylonychia mytilus. EMBO Journ., 2, 1753 - 1757

Meine akademischen Lehrer waren:

Anorganische Chemie: Frau S. Kemmler-Sack, J. Strähle, G. Pausewang, E. Lindner, W. Rüdorff, J. Gelinek

Biochemie: J. Guglielmi, G. Weitzel, H. Probst

Botanik/Pflanzenphysiologie: F.W. Bentrup, F. Oberwinkler, H.U. Seitz, W. Engelmann, D. Gradmann, A. Hager, B. Schwemmle, K. Drumm,

Organische Chemie: E. Bayer, H. Stegmann, M. Hanack, H. Meier, H. Suhr, H. Straub

Pharmakologie: M. Siess, D. Winne

Physikalische Chemie: D. Oelkrug, B. Haas,

Physik: F. Gönnenwein, W. Nakel

Physiologie: E. Betz, R. Jacob, W. Harder

Theoretische Chemie: F.F. Seelig

Zoologie: D. Ammermann, H.J. Lipps, W. Engels, C. Meier-Brook, G. Mikoleit, D. Bunke, W. Rähle, W. Seifert (MPI).

LEBENSLAUF

Margitt Maria Wieser
geb. 15. März 1955 in Ellwangen

Schulbildung

1961 - 1965	Grundschule Rainau-Buch
1965 - 1971	Realschule St. Gertrudis/Ellwangen
1971 - 1974	Peutinger Gymnasium/Ellwangen
Juli 1974	Abitur

Studium

WS 1974/75 - WS 1979/80	Studium der Biologie und Chemie an der Universität Tübingen
Herbst 1979	Staatsexamen Chemie
Herbst 1980	Staatsexamen Biologie
1980 - 1981	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Ammermann, Institut für Biologie III, Abteilung Zellbiologie, Universtität Tübingen. Thema der Arbeit: "Untersuchungen zur Genexpression bei dem Ciliaten Stylonychia mytilus. - Ein Vergleich von vegetativen Zellkulturen mit Kulturen nach erfolgter Konjugation."
September 1981	Diplom in Biologie
Frühj. 1982- Herbst 1984	Doktorandin bei Prof. Dr. Ammermann am selben Institut Thema der Promotionsarbeit: "Untersuchungen zur Genexpression bei dem Ciliaten Stylonychia lemnae nach Behandlung mit dem Pflanzenlectin Concanavalin A."

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)